

**Dibenzilbutirolakton lignánok azonosítása, bioszintézisük  
nyomon követése *Arctium*, *Centaurea*, *Cirsium* fajok  
terméseiben és mennyiségi meghatározása *Centaurea*  
termésekben és *in vitro* sejttenyészetekben**

**Szokol-Borsodi Lilla**

**Témavezetők:**

**Dr. Böddi Béla**  
tanszékvezető egyetemi tanár  
az MTA doktora

**és**

**Dr. Gyurján István†**  
professor emeritus  
az MTA doktora

**ELTE Biológia Doktori Iskola**

**Vezetője: Dr. Erdei Anna**

**Kísérletes Növénybiológia Doktori Program**

**Programvezető: Dr. Szigeti Zoltán**



**ELTE Növény szervezettani Tanszék**

**Budapest**

**2013**

**Id. Dr. Béres József iránymutató gondolata:**

*"Mert ott van a  
megoldás a természetben,  
csak nyitott szemmel  
és elmével kell járni"*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Béres József', with a stylized flourish above the name.

|   |    |
|---|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....  | 4  |
| II. IRODALMI BEVEZETŐ.....  | 6  |
| II.1. A lignánok általános jellemzői .....  | 6  |
| II. 2. A lignánok előfordulása.....   | 9  |
| II.3. A lignánok bioszintézise.....   | 12 |
| II.4. A lignánok gyógyászati hatásai és hatásmechanizmusai.....                                   | 14 |
| II.5. Glikozidok és aglikonok in vivo: a növényi $\beta$ -glikozidáz enzim .....                  | 18 |
| II.6. Kémiai analízis .....   | 19 |
| II.6.1. Extrakció.....  | 19 |
| II.6.2 Minőségi meghatározás .....  | 19 |
| II.8. A lignánok mennyiségi és minőségi változása a termés érése során .....                      | 23 |
| II.9. Centaurea fajok in vitro szövettényészete .....   | 23 |
| II.10. A hatóanyagtermelés és az organogenezis összefüggései .....                                | 25 |
| III. CÉLKITŰZÉSEK .....   | 27 |
| IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....  | 28 |
| IV.1. Növényi minták.....   | 28 |
| IV.1.1. Növényi minták.....   | 28 |
| IV.1.2. A termésérés folyamata.....   | 29 |
| IV.1.3. A csírázás folyamata .....  | 29 |
| IV.1.4. A kaszattermés részeinek szétválasztása.....  | 30 |
| IV.2. Vegyszerek, reagensek.....  | 30 |
| IV.3. Növényi szövettényésztés .....  | 30 |
| IV.3.1. A különböző <i>Centaurea</i> fajok kallusztényészeteinek létrehozása és fenntartása ..... | 30 |
| IV.3.2. A munkában használt táptalajok összetétele .....  | 31 |
| IV.3.4. A sejkultúra biomasza növekedésének vizsgálata .....                                      | 31 |
| IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok.....   | 32 |
| IV.4.1. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok .....                                     | 32 |
| IV.4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok .....   | 32 |
| IV.4.3. Fénymikroszkópos és sztereomikroszkópos vizsgálatok .....                                 | 32 |
| IV.4.4. A mikroszkópos minták értékelése .....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| IV.5. Kémiai analízis.....  | 33 |
| IV.5.1. Lignán extrakció .....  | 33 |
| IV.5.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás ultraibolya<br>spektrofotometriás (UV) és tömeg spektrometriás (MS) detektálással .....  | 33 |
| IV.6. Glikozidáz enzim hidrolízis .....   | 33 |
| IV.7. Savas hidrolízis .....  | 34 |
| IV.8. Az eredmények statisztikai értékelése .....   | 34 |
| V. EREDMÉNYEK .....   | 35 |
| V.1. A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása .....   | 35 |
| V.1.1. A lignánösszetétel folyadékkromatográfiás meghatározása .....  | 35 |
| V.2. A lignánösszetétel változása a termés érése és csírázása során .....   | 41 |
| V.2.1. A lignánösszetétel változása a termésérés során .....  | 41 |
| V.2.2. A lignánösszetétel változása a csírázás során és a lignánok megoszlása a kaszattermés<br>termésfala és az embrió részei között: natív, csíráztatott, és glikozidáz enzimmel hidrolizált<br>minták..... | 43 |
| V.3. A <i>Centaurea</i> fajok terméseinek lignánösszetétel vizsgálata .....   | 48 |
| V.3.1. A natív minták lignánösszetétele.....  | 48 |
| V.3.2. A hidrolizált minták lignánösszetétele .....   | 51 |
| V.4. A <i>Centaurea</i> fajok szövettanészeteinek létrehozása, lignán összetételének és mennyiségének<br>vizsgálata, valamint morfológiája .....  | 51 |
| V.4.1. A <i>Centaurea</i> fajok szövettanészeteinek létrehozása .....   | 52 |
| V.4.2. A <i>Centaurea adjarica</i> biomassza termelése.....   | 52 |
| V.4.3. Az <i>in vitro</i> kallusz kultúrák differenciációja .....   | 53 |
| V.4.3. Az <i>in vitro</i> kallusz kultúrák lignán összetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint<br>az egyes kultúrák differenciálódott részeinek lignán tartalma .....                                 | 61 |
| VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA .....   | 65 |
| VI.1. A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása .....  | 66 |
| VI.1.1. A lignánösszetétel folyadékkromatográfiás meghatározása .....   | 66 |
| VI.2. A lignánösszetétel változása a termés érése és csírázása során .....  | 67 |
| VI.2.1. A lignánösszetétel változása a termésérés során .....   | 67 |

|  |    |
|--|----|
| VI.2.2. A lignánösszetétel változása a csírázás során és a lignánok megoszlása a kaszattermés<br>termésfala és az embrió részei között: natív, csíráztatott, és glikozidáz enzimmel hidrolizált<br>minták..... | 68 |
| VI.3. A <i>Centaurea</i> fajok terméseinek lignánösszetétel vizsgálata.....  | 69 |
| VI.3.1. A natív minták lignánösszetétele .....   | 69 |
| VI.3.2. A hidrolizált minták lignánösszetétele .....   | 71 |
| VI.4. A <i>Centaurea</i> fajok szövettényészeteinek létrehozása, lignán összetételének és mennyiségének<br>vizsgálata, valamint morfológiája .....   | 71 |
| VI.4.1. A <i>Centaurea</i> fajok szövettényészeteinek létrehozása .....  | 72 |
| VI.4.2. Az <i>in vitro</i> kallusz kultúrák differenciációja.....  | 72 |
| VI.4.3. Az <i>in vitro</i> kallusz kultúrák lignán összetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint<br>az egyes kultúrák differenciálódott részeinek lignán tartalma .....                                 | 74 |
| VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....  | 77 |
| VIII. ÖSSZEFOGLALÁS .....  | 79 |
| VIII. SUMMARY .....  | 80 |
| IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....  | 81 |
| X. IRODALOMJEGYZÉK.....  | 82 |
| XI. FÜGGELÉKEK .....   | 95 |

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

**2,4-D:** 2,4-diklórfenoxiecetsav

**argen:** arctigenin

**B5:** Gamborg B5 táptalaj 0,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D hormon mennyiséggel

**EnzHidr:**  $\beta$ -glikozidáz enzimmel hidrolizált

**ESPI:** Elektrospray ionizáció pozitív ion módban

**GS-1:** érett termés

**GS-2:** gyököcske megjelenése

**GS-3:** gyököcske mérete megegyezik a termés méretével

**GS-4:** a terméshal és az embrió teljesen különválnak egymástól

**HPLC** (High Pressure Liquid Chromatography): nagyhatékonyságú folyadék kromatográfia

**m/z:** tömeg/töltés

**mat:** matairesinol

**matgl:** matairesinosid

**MS:** tömeg spektrométer

**MSA 30:** Murashige Skoog táptalaj 2 mg l<sup>-1</sup> NAA és 0.2 mg l<sup>-1</sup> kinetin tartalommal, 30 g l<sup>-1</sup> szacharóz mennyiséggel

**Mw** (molecule weight): molekulatömeg

**NAA** (1-naphtylacetic acid): naftilecetsav

**nk:** nem kvantifikálható

**PAL:** fenilalanin ammónium liáz

**PRL:** pinoresinol/lariciresinol reduktáz enzim

**RS-1:** teljes virágzás

**RS-2:** hervadó párta

**RS-3:** teljesen elfonnyadt, lehulló párta

**RS-4:** érett termés

**RSD:** relatív standard deviáció

**SzT:** száraz tömeg

**TFE:** trifluor-ecetsav

**trache:** trachelogenin

**t<sub>R</sub>:** retenció idő

**UV:** ultraibolya

# I. BEVEZETÉS

Napjainkban világszerte egyre nagyobb a gyógyszeripar érdeklődése is a biológiai készítmények előállítása iránt (<https://www.richter.hu/HU/Pages/biotech.aspx>), amely az egyes biológiai szakterületek, mint például a biotechnológia, jelentőségét is megnöveli. Az Egyesült Államokban 2011. októbere és 2012. szeptembere között 35 új innovatív gyógyszert engedélyeztek, pontosan ugyanannyit, mint az azt megelőző egy éves időszakban ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

A természetes eredetű hatóanyagok iránti érdeklődés nemcsak a gyógyszeriparban jelenik meg, hanem a kozmetikai ipar és a természetgyógyászok is előszeretettel használják fel a természetes vegyületeket tartalmazó készítményeket, termékeket.

A fokozott kereslet miatt az intakt növényekből történő hatóanyag kinyerés mellett az *in vitro* sejtenyészeteket egyre nagyobb mértékben alkalmazzák a másodlagos anyagcseretermékek előállítására, mivel a sejt kultúrákban a biológiailag aktív vegyületek szabályozott, optimalizált körülmények között termeltethetők. Ezen felül könnyebb és hatékonyabb az anyagok kivonása, és olyan új anyagcseretermék előállítására is nyílnak lehetőségek, amely az intakt növényben nem képződik, kémiai szintézissel történő előállítása viszont még nem ismert, vagy nem kellőképpen költséghatékony.

Az analitikai módszerek fejlődésével, és az igen változatos gyógyászati felhasználhatóság miatt nőtt meg a fenoloidok közé tartozó lignánok iránti érdeklődés. A lignánok gyógyászati alkalmazási lehetőségei igen széles spektrumúak. A kutatások középpontjába az utóbbi évtizedben az arctigenin, a matairesinol, a trachelogenin, illetve ezek glikozidjai állnak. Biológiai hatásvizsgálatok során igazolódott ezeknek a lignánoknak a rákellenes, HIV ellenes, gyulladáscsökkentő, máj- és idegrendszer védő tulajdonsága, illetve szabadgyök fogó képessége is.

Az arctigenin, a matairesinol, a trachelogenin, illetve ezek glikozidjai több nemzetségben is jelentős mennyiségben fordulnak elő, melyek többek között az *Arctium*, *Centaurea*, *Cirsium*, *Ipomoea* illetve a *Forsythia*.

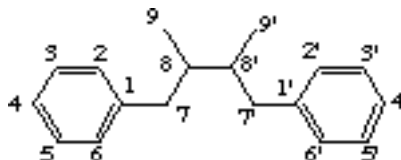
Munkánkban a korábban említett lignánokat, és glikozidjaikat vizsgáltuk *Arctium*, *Centaurea*, és *Cirsium* termésekben, illetve *Centaurea in vitro* kultúrákban annak érdekében, hogy e hatóanyagok nagy mennyiségben, és tiszta formában előállíthatóak legyenek egy későbbi, gyógyszeripari felhasználás céljából.

## II. IRODALMI BEVEZETŐ

### II.1. A lignánok általános jellemzői

Napjainkban egyre nagyobb az érdeklődés a természetes eredetű hatóanyagok iránt. Jelenleg a forgalomban lévő gyógyszerek 25-30%-a növényi eredetű, így megállapítható a hatóanyagok fokozott térhódítása a gyógyászatban. Ezek a hatóanyagok döntő többségükben a növény másodlagos anyagcseretermékei közül kerülnek ki. Míg az elsődleges anyagcseretermékek, melyek biológiai szempontból nélkülözhetetlen vegyületek, felépítése és lebontása organizmustól függetlenül hasonló módon játszódik le, addig a másodlagos anyagcseretermékeké nem, csak bizonyos élőlényekben, bizonyos vegyületek keletkeznek, vagyis erős specificitást mutatnak. Ezek közül a vegyületek közül kerülnek ki a lignánok is. A lignánok széles körben előfordulnak a növényvilágban, megtalálhatóak a harasztokban, a nyitvatermőkben, és a zárvatermőkben is (Ghisalberti 1997).

A lignánok definíciója Haworth-tól származik (1936), mely szerint a lignánok a növényi fenoloidok egyik csoportja, és szerkezetük két fahéjsav származék, vagy biogenetikai ekvivalensük egyesüléséből alakul ki (1. ábra). A szerkezetükből adódóan a lignánok száma igencsak korlátozódhatna, azonban az alifás molekula részen előforduló egy vagy két kettős kötéssel, illetve a különböző szubsztituensek (többnyire hidroxil-, metoxi-, metilén-dioxi-, vagy glükóz csoport) kapcsolódása révén az egyik, vagy mindkét aromás gyűrűhöz és/vagy alifás szénatomhoz, szerkezetük tovább variálódhat. Többször átfogalmazták már ezt a meghatározást, így jelenleg nemcsak a dimerek, de az oligomerek is ide tartoznak szeszkvilignánként. Emellett a propil oldalláncok központi 8-as szénatomjai közötti kötésen kívül egyéb kötési helyeket is magába foglaló csoport, a neolignán, is ide tartozik (Moss 2000).



1. ábra A lignánok általános szerkezete

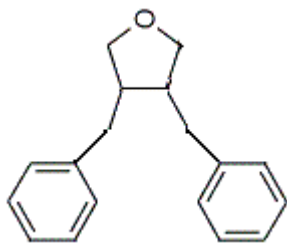
A lignánokat 8 fő csoportba sorolják (furán-, furofurán-, dibenzilbután-, dibenzilbutirolaktol-, dibenzilbutirolakton-, ariltetralin-, arilneftalin- és dibenzociklooktadién-



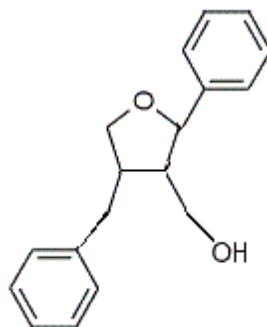
alapvázak; 2. ábra) az oxigén atom vázon belüli elhelyezkedése, és a gyűrűk kialakulása szerint (Umezawa 2003, Suzuki és Umezawa 2007).

A lignánok iránti érdeklődés igen jelentős volt nemcsak az elmúlt években, de jelenleg is intenzíven folynak a kutatásuk, mivel a természetben széles körben előfordulnak (leginkább a növényvilágban), és biológiai hatásuk is igen széles körű (MacRae és Towers 1984). Számos tudományos cikk taglalja a lignánok egyes élőlényekre kifejtett hatását, beleértve az embert is, mind molekuláris, enzimátikus, élettani, farmakológiai, sőt még klinikai szinten is, ám magában az őt termelő növényben betöltött szerepéről már sokkal kevesebb az elérhető információ (Harmatha és Dinan 2003).

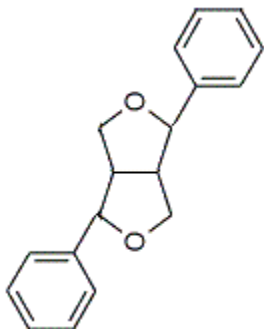
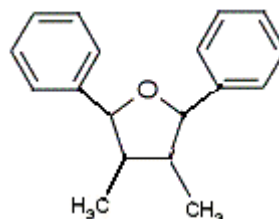
A lignánok szerepet játszanak a növényi védekezésben antibakteriális, antivirális, antifungális, antioxidáns, valamint rovarölő hatásuk miatt (Ayres és Loike 1990). Fitoalexinként működhetnek, amelyre nemcsak a patogénnel szemben előnyös tulajdonságaik, de a növényi szöveteken belüli elhelyezkedésük is utal (Burlat és mtsai 2001, Kwon és mtsai. 2001). A lucfenyő matairesinolt termel gombafertőzéssel szemben, ami korlátozza a gomba további növekedését (Hart és mtsai. 1975). Az *Aegilops ovata* (*Poaceae*) szemterméséből izolált lignán csírázást gátló hatást gyakorolt fejes saláta (*Lactuca sativa*) magokra (Lavie és mtsai. 1974).



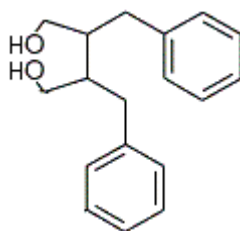
Furán 9(9')-oxigénnel



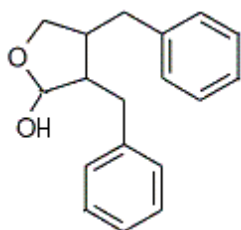
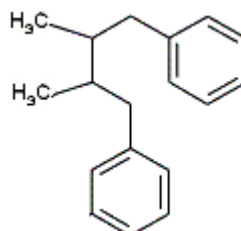
Furán 9(9')-oxigén nélkül



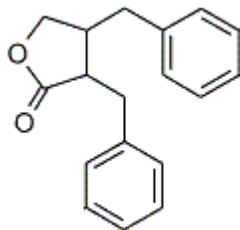
Furofurán



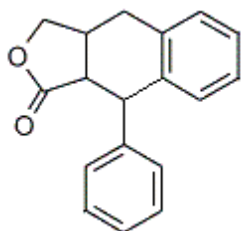
Dibenzilbután 9(9')-oxigénnel és 9(9')-oxigén nélkül



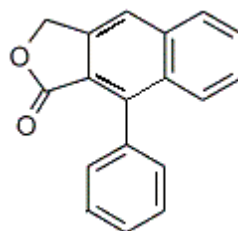
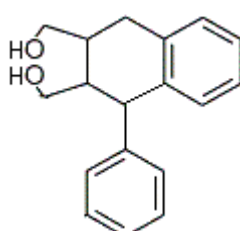
Dibenzilbutirolaktol



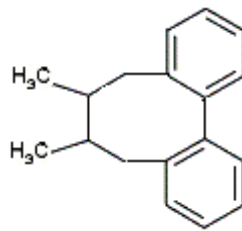
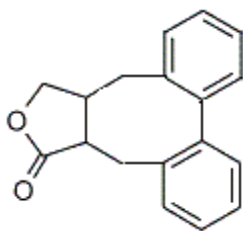
Dibenzilbutirolakton



Ariltetralin



Arilnaftalin



Dibenzociklooktadién 9(9')-oxigénnel és 9(9')-oxigén nélkül

**2. ábra** A lignántípusok alapvázai Umezawa (2003) cikke alapján

A növény-rovar kölcsönhatásban, a növényevőkkel szembeni védekezésben is szerepet játszanak a lignánok (Schröder és mtsai. 1990). A *Piper futokadzura* és a *Libocedrus vateensis* fajból izolált lignánnál igazolták ezt (Seigler 1998), illetve a *Melia azedarach* fajnál a pinoresinol esetében (Cabral és mti 1999).

A lignánok növényekben betöltött szerepe mellett, a gyógyászati felhasználása is jelentős. A legelső dokumentált orvosi alkalmazásuk több mint ezer éves (Kelly és Hartwell 1954 cikke szerint). A feljegyzések Dél-Amerikából származnak és a *Podophyllum* növény használatával kapcsolatosak. Európában egy korai angol orvosi könyv, Bald Felcserkönyve írja le elsőször egy lignánokat tartalmazó növény, a vad turbolya (*Chaerophyllum bulbosum* L.) felhasználását, melynek gyökeréből készült kenőcsöt rák gyógyítására javallták (Cockayne 1961 írása alapján). Kb. 400-600 évvel ezelőtt a Föld két táján, a Himalájában és az amerikai penobszokot indiánok egy időben fedezték fel újra a *Podophyllum* fajt, mely rhizomájának alkoholos kivonatából keletkező gyanta hashajtó- és mérgező hatású volt (Imbert 1998). Ennek a növénynek a hatóanyaga a podophyllotoxin lignán, amely az egyik legfontosabb alkotóeleme az egyik legismertebb kemoterápiában alkalmazott gyógyszernek, az Etopophosnak<sup>®</sup>. A teniposide (Vumon<sup>®</sup>) szintén egy podophyllotoxint is tartalmazó kemoterápiás szer. Mindkettő hatásmechanizmusát tekintve topoizomeráz II enzim gátló, ezzel megakadályozva a rákos sejtek intenzív szaporodását (Gordaliza és mtsai. 2004).

## **II. 2. A lignánok előfordulása**

Lignánok jelentősége az utóbbi évtizedekben nőtt meg az igen sokoldalú gyógyászati hatásuknak köszönhetően, ezért megnőtt az érdeklődés a lignánok azonosítása iránt a különböző növény családokban, és fajokban (1. Táblázat) egyaránt. Így a korábban elkezdett kemetaxonómiai vizsgálatok köre bővül, és idővel lehetővé válik a lignánt termelő növények filogenetikai eloszlásának elemzése is (Umezawa 2003).

**1. Táblázat** A matairesinol, az arctigenin, valamint a trachelogenin és ezek glikozidjainak előfordulása növény családokban

| Családok              | Fajok   | Azonosítás                                | Mérés   | Hivatkozás                                  |
|-----------------------|---|---|---|---|
| <i>Apiaceae</i>       | <i>Anthriscus sylvestris</i>  | argen, mat                                |   | Koulman és mtsai 2003                       |
| <i>Apocynaceae</i>    | <i>Trachelospermum axillare</i><br><i>Trachelospermum jasminoides</i> | argen, mat,<br>trache<br>trache<br>trache |   | Nishibe és mtsai 1993<br>Tan és mtsai. 2005 |
| <i>Asteraceae</i>     | <i>Arctium lappa</i>  | trache                                    | arctiin (7,5%),<br>argen (0,89%)                                    | Liu és mtsai 2010<br>Nose és mtsai 1992     |
|                       | <i>Carthamus tinctorius</i>   | trache                                    |   | Nose és mtsai 1992                          |
|                       | <i>Cynara cardunculus</i>   | argen,<br>arctiin                         |   | Koubaa és mtsai 1999                        |
|                       | <i>Centaurea urvillei</i>   | arctiin,<br>matgl                         | arctiin(1,2%),<br>matgl (5,6%)                                      | Shoeb és mtsai 2007a                        |
|                       | <i>Centaurea scabiosa</i>   | argen,<br>h-argen,<br>mat, matgl          | argen (0,03%),<br>h-argen (0,01%),<br>mat (0,11%),<br>matgl (0,16%) | Ferguson és mtsai 2003                      |
|                       | <i>Cirsium arvense</i>  | trache                                    |   | Boldizsar és mtsai 2010b                    |
|                       | <i>Cnicus benedictus</i>  | trache<br>argen                           |   | Vanhaelen és Vanhaelen-Fastre 1975          |
|                       | <i>Leuzea carthamoides</i>  | trachelosid                               |   | Harmatha és mtsai 2007                      |
| <i>Convolvulaceae</i> | <i>Ipomoea cairica</i>  | argen,<br>trache                          | argen (0,015%)  | Páska és mtsai 1999                         |
| <i>Cupressaceae</i>   | <i>Cupressocyparis leylandii</i>                                      | argen                                     |   | Tanaka és mtsai 2008                        |
| <i>Linaceae</i>       | <i>Linum usitatissimum</i>  | mat                                       |   | Degenhardt és mtsai. 2002                   |
|                       | <i>Linum flavum</i>   | mat                                       |   | Xia és mtsai 2000                           |
| <i>Oleaceae</i>       | <i>Forsythia x intermedia</i>   | argen, mat                                | argen (3,3%);<br>mat (1,1%)   | Rahman és mtsai 1990a                       |
| <i>Taxaceae</i>       | <i>Torreya nucifera</i>   | argen                                     |   | Kim és mtsai 2003                           |
| <i>Thymelaeaceae</i>  | <i>Daphne odora</i>   | mat                                       |   | Okunishi és mtsai 2004                      |

A lignánok vizsgálata során a hatóanyagok azonosítására fektették a kutatók a nagyobb hangsúlyt, mennyiségi meghatározást a növények kisebb hányadánál végeztek (1. és 2. Táblázat).

Számos család tagjaiban mutatták ki a dibenzilbutirolakton lignánokat, amelyek közül az arctigenin glikozidja, az arctiin kemotaxonómiai bélyeg az *Asteraceae* családban (Hansel

és mtsai. 1964), ezen belül is a *Cynareae* nemzetség csoporton belül a *Carduinae*, és a *Centaurinae* alnemzetség csoportokra jellemző ez a lignán típus. A többi alnemzetség csoportban nem található meg.

**2. Táblázat** A matairesinol, valamint az arctigenin, és ezek glikozidjainak előfordulása a *Centaurea* nemzetségben

| Fajok                  | Azonosítás                    | Hivatkozás                |
|------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>C. affinis</i>      | argen, mat                    | Janačković és mtsai. 2004 |
| <i>C. americana</i>    | arctiin, matgl                | Cooper és mtsai. 2002     |
| <i>C. americana</i>    | arctiin, argen,<br>mat, matgl | Shoeb és mtsai. 2006      |
| <i>C. aspera</i>       | mat                           | Marco és mtsai. 1992      |
| <i>C. cuneifolia</i>   | argen                         | Aslan és Öksüz 1999       |
| <i>C. grisebachii</i>  | argen                         | Djeddi és mtsai. 2008     |
| <i>C. isaurica</i>     | arctiin                       | Flamini és mtsai. 2004    |
| <i>C. macrocephala</i> | argen                         | Ribeiro és mtsai. 2002    |
| <i>C. macrocephala</i> | arctiin, mat, matgl           | Shoeb és mtsai. 2004b     |
| <i>C. nigra</i>        | arctiin, argen,<br>mat, matgl | Middleton és mtsai. 2003  |
| <i>C. pamphylica</i>   | arctiin, mat, matgl           | Shoeb és mtsai. 2007b     |
| <i>C. ptosimopappa</i> | argen, mat                    | Çelik és mtsai. 2006      |
| <i>C. scabiosa</i>     | argen, mat, matgl             | Ferguson és mtsai. 2003   |
| <i>C. schischkinii</i> | arctiin, argen,<br>mat, matgl | Shoeb és mtsai. 2005      |
| <i>C. solstitialis</i> | argen, mat                    | Bruno és mtsai. 1991      |
| <i>C. tweediei</i>     | argen, mat                    | Fortuna és mtsai. 2001    |

A táblázatos összefoglalókból kitűnik (1. és 2. Táblázat), hogy a lignánokat számos fajban kimutatták, illetve a *Centaurea* nemzetség egyes fajaiban is előfordulnak. Kutatásaink tárgyául azért választottuk e nemzetség fajait, mert ez a nemzetség hazánkban széles körben ismert és elterjedt, és az ELTE TTK Növényyszervezettani Tanszék Biotechnológia laborja hosszú évek óta foglalkozik növényi másodlagos anyagcseretermékekkel, úgy mint az alkaloidokat és lignánokat tartalmazó és *in vitro* kultúrájukban is termelő, növényekkel. Ezek a növények számos családból kerültek ki, mint a *Convulaceae* (Páska és mtsai. 1999), *Oleaceae* (Sedlák és mtsai. 2008), és *Asteraceae* (Szokol-Borsodi és mtsai. 2012). Az egyes fajok - mint növényi minta - kiválasztásánál fő szempont volt, hogy az adott növény széles körben hozzáférhető legyen, és a lignánokat tiszta formában, nagy mennyiségben tartalmazza,

illetve, hogy a fajok lignán tartalma, sejt kultúrájának létrehozása, illetve ezek lignán termelése perspektivikus legyen.

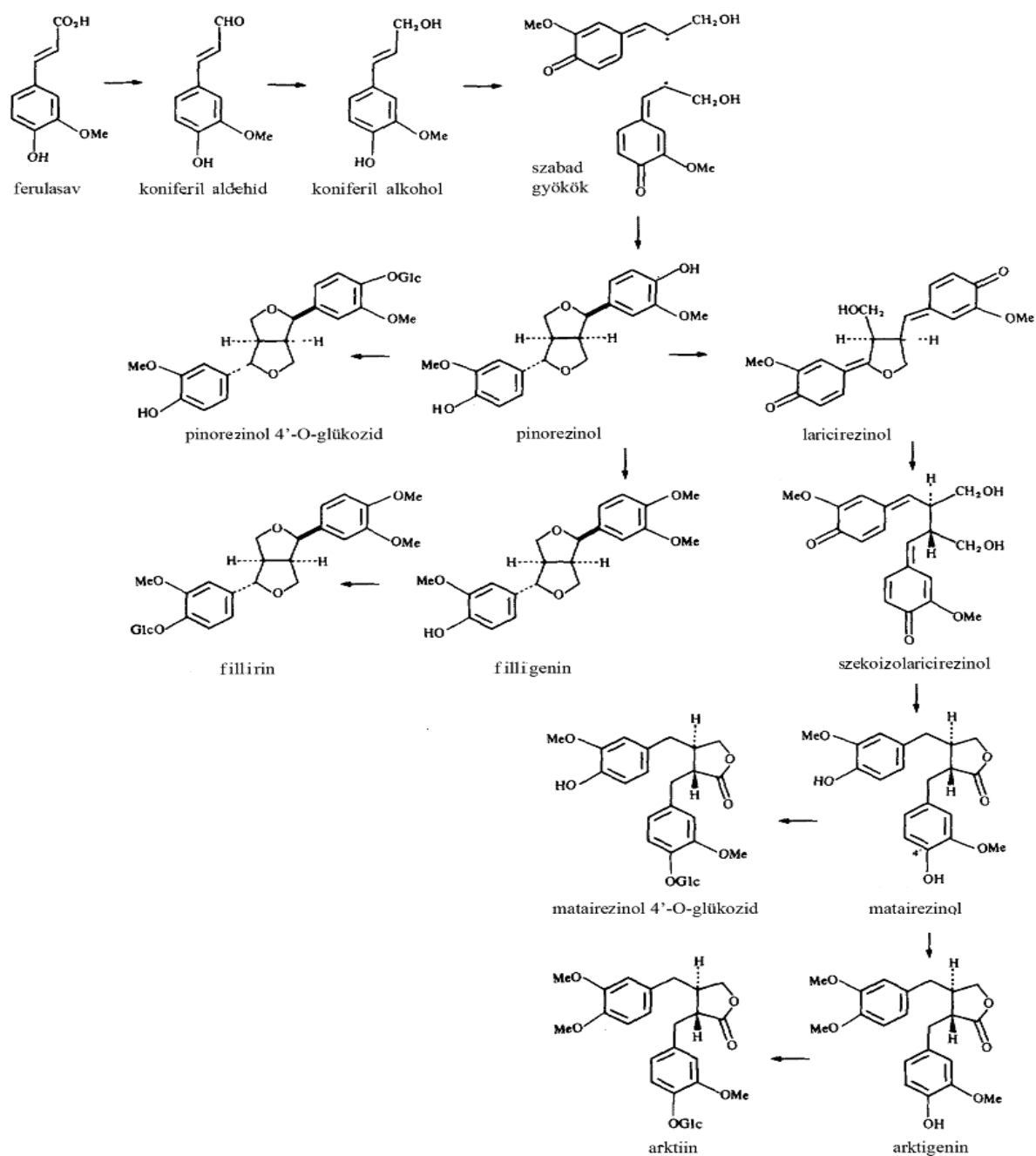
### **II.3. A lignánok bioszintézise**

A lignánok bioszintézise szorosan kapcsolódik a lignin szintéziséhez (Lewis és mtsai. 1998). Együttesen az egyik legenergiaigényesebb anyagcseretermékek a növényekben, és többségében a lignin prekursorokkal együtt a sikimisav útvonalon fenilalaninon, fahéjsavon, majd koniferil alkoholon keresztül szintetizálódnak (Seigler 1998). A lignánok bioszintézis útvonalának felderítésének jövőbeni célja lehet a lignánok mennyiségének növelése rákmegelőző élelmiszerekben, gyógyszerkészítmények előállításában (pl. podophyllotoxinból az Etopophos<sup>®</sup>), vagy a lignánok antioxidáns kapacitásának kihasználásában.

A lignin és a lignánok szintézise a monolignolok (monomer lignán prekursorok) kialakulása után válik el egymástól (Raffaelli és mtsai 2002). A bioszintézis útvonal további kiemelt lépései (3. ábra), hogy a citoplazmából a sejt falba szállított koniferil alkohol a nem specifikus oxidáz enzim és az úgynevezett irányító fehérjék közreműködésével sztereoszelektíven és szabályozottan alakul át pinoresinollá (Gang és mtsai 1999, Davin és Lewis 2000). A dibenzilbutirolakton lignánok a bioszintézis későbbi lépéseiben jönnek létre és optikailag tiszták, és többségében aktívak (Umezawa 2003).

A következő lépésben a pinoresinol/lariciresinol reduktáz enzim játszik szerepet, amely egy NADPH függő kettős funkciót betöltő fehérje. Ez az enzim alakítja át sztereoszelektíven a pinoresinolt lariciresinollá, illetve a lariciresinolt secoisolariciresinollá (Davin és mtsai. 1992, Katayama és mtsai. 1992, Dinkova-Kostova és mtsai. 1996).

Ezen enzim jelentőségét jelzi, hogy a kodoló génjét is meghatározták és ennek segítségével az adott lignán szöveteken belüli elhelyezkedését is feltárták (Burlat és mtsai. 2001, Kwon és mtsai. 2001). A secoisolariciresinol dehidrogenáz enzim enantioszelektív oxidációval alakítja át matairesinollá a secoisolariciresinolt (Xia és mtsai. 2001). Metiláció útján keletkezik a matairesinolból az arctigenin (Ozawa és mtsai. 1993).



**3. ábra** Az arctigenin, matairesinol és glikozidjaik bioszintézise (Rahman és mtsai (1990a) illetve Umezawa (2003) cikkei alapján)

A koniferil alkoholtól a matairesinolog tartó útvonal közösnek tekinthető a lignán bioszintézisben, mivel ezt számos növény esetében leírták. Sztereokémiai szempontból viszont a fajok között nagy változatosságot mutat ez a bioszintézis szakasz (Umezawa 2003). Például a *Forsythia* fajokban (+)-pinoresinol, a *Daphne tangutica* fajban (-)-pinoresinol keletkezik (Zhuang és mtsai 1982). Emellett a különböző növényi szervekben is eltérő

sztereoszelektivitású lignánok szintetizálódnak, amely a szintézisben résztvevő eltérő izoenzimek jelenlétére utalnak (Suzuki és mtsai 2002).

A bioszintézis útvonal egyre pontosabb megismerése, a résztvevő enzimek és az irányító fehérjék gén szinten történő feltérképezése lehetővé teszi a bioszintézis célzott módosítását. Kim és munkatársai (2009) a pinoresinol/lariciresinol reduktáz (PLR) enzim működését szabályozták az enzim interferencia RNS-ének a segítségével. A géntranszformált *Forsythia koreana* sejtenyészet sejtjeiben a PLR-interferencia RNS-t fokozott mértékben expresszáltatták, emiatt a PLR enzim alulműködött. Ennek következtében a pinoresinol-matairesinol átalakulás nem zajlott le, a pinoresinol közel 20-szoros mennyiségben halmozódott fel, ráadásul egy másik lignán, a szezamin is szintetizálódott.

A lignánok közül a dibenzilbutirolakton lignánokat, az arctigenint, a matairesinolt, és a trachelogenint, valamint ezek glikozidjait helyeztük vizsgálataink középpontjában, melyek az *Arctium lappa*, *Centaurea* fajok, és a *Cirsium arvense* növényben termelődnek nagy mennyiségben.

## **II.4. A lignánok gyógyászati hatásai és hatásmechanizmusai**

Az általunk vizsgált növényfajokban megtalálható lignánok közül az arctigenin hatását vizsgálták a legtöbben. Az arctigenin jótékony hatása igazolódott már vastagbél- (Hausott és mtsai. 2003, Yoo és mtsai. 2010), hasnyálmirigy- (Awale és mtsai. 2006), máj- (Kang és mtsai. 2007), bőr- és tüdőrák (Takasaki és mtsai. 2000), valamint leukémia (Hirano és mtsai. 1994), HIV-vírus (Schröder és mtsai. 1990, Vlietinck és mtsai. 1998) esetén. Az idegrendszerre gyakorolt jótékony hatása mellett (Jang és mtsai. 2002) májvédő (Kim és mtsai. 2003), és gyulladáscsökkentő tulajdonságát is leírták (Cho és mtsai. 2004, Kang és mtsai. 2008).

Hausott és munkatársai szerint (2003) arctigeninnel végzett kezelés apoptózist indukált vastagbélrákos sejtekben. Az apoptózishoz kapcsolódó fehérjék mennyiségi változásait mérték és így kimutatták, hogy az arctigenin hatékonyabb volt az arctiinnél, az arctigenin glikozidos formájánál. Hasonló megállapításokra jutottak Yoo és mtsai (2010) is. Munkájuk során megerősítették, hogy a vastagbélrákos sejtekben az arctigenin rendelkezik a legerősebb apoptózist indukáló hatással az arctiinnel és matairesinollal szemben. A lignánok a hatásukat Wnt/ $\beta$  katein szignáltranszdukciós útvonal gátlásán keresztül érték el. Szintén az



apoptózis indukálásán keresztül hatott az arctigenin Hirano és munkatársai (1994) *in vitro* kísérleteiben leukémia sejtek esetén.

Awale és munkacsoportja által 2006-ban publikált cikkben arról számolnak be, hogy *Arctium lappa*-ból (bojtorján) sikerült egy olyan anyagot izolálniuk, az arctigenint, mely 100 %-os preferenciális citotoxicitást mutatott „éheztetett” hasnyálmirigy rákos sejteknél. A rákos sejtek toleranciáját csökkentette az arctigenin, ez által fejtette ki jótékony hatását. Tápanyaghiány esetén a hasnyálmirigyrák sejtek nagymértékben expresszálnak kináz B/Akt fehérjét, aminek a foszforilációját gátolja az arctigenin. Ennek következtében a PANC-1 sejtek nekrotizálódnak.

Bőr- és tüdőrák esetén Takasaki és munkatársai (2000) *in vivo* eger kísérletekben igazolták a lignánok rákellenes hatását. Kimutatták, hogy a tüdőráknál az aglikonos forma, az arctigenin erősebb gátlószer az arctiinnél, viszont a bőrrák esetén ezzel ellentétes jelenséget tapasztaltak. A bőrrák vizsgálatánál az aglikonos és a glikozidos lignán forma egyforma mértékben gátolta a papillómák kialakulását, függetlenül attól, hogy az egereknek szájon át adagolták a lignánokat vagy a bőrfelületet kezelték. A szájon át történő lignán bevitelnél az arctiinnél a bélrendszer mikroflórájának enzimek lehasítják a glukózt, így a véráramba az aglikonos forma jut be (Nose és mtsai 1992 és 1993). Viszont a bőrrák esetén ez nem okozott különbséget az eltérő módon végzett kezelések hatásossága között. Kang és munkatársai (2007) az aglikonos és a glikozidos lignán forma hatékonysága közötti eltérést a két molekula membrán permeabilitása közötti különbséggel magyarázta.

Kang és munkatársai (2007) humán és eger májrák sejteken vizsgálták az arctigenin, matairesinol, valamint ezek glikozidos formáinak hatását. A lignánok az apoptózis és a II. fázisú detoxifikáló enzim indukációján keresztül fejtették ki gátló hatásukat. Az aglikonos formák ebben az esetben is hatékonyabbak voltak a glikozidos formáknál, és az arctigenin bizonyult a legerősebb gátlószernek. Mint azt már említettük, Kang és munkatársai a két lignánforma hatékonysága közötti eltérést a két molekula membrán permeabilitása közötti különbséggel magyarázták.

Kim és munkatársai (2003) arról számolnak be, hogy *Torreya nucifera* kéregből sikerült arctigenint izolálniuk. *In vitro* vizsgálták ennek hatását széntetrakloriddal (CCl<sub>4</sub>) kezelt patkány májsejtekben, és azt tapasztalták, hogy a molekula megköti a szabadgyököket, ezáltal segíti a sejtek gyökfogó kapacitását.

Az arctigenin idegsejteket érintő hatásainak vizsgálata során elsősorban neuroprotektív aktivitását mutatták ki (Jang és mtsai 2002). Idegi szövettenyészetben az arctigenin közvetlenül kötődik a szinaptikus membránon lévő kainát receptorokhoz, gátolva ezzel a központi idegrendszer fő serkentő transzmitterének, a glutamátjának a kötődését, erős aktiváló hatását. A glutamát kötődése ioncsatornákat megnyitva kóros mértékű  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást, és szabadgyök képződést eredményezhet, ami végső soron az idegsejtek degradációjához vezethet.

Szintén az arctigenin neuroprotektív hatását igazolta Swarup és munkatársai (2008) is egy *in vivo* kísérletben, ahol Japán encephalitis vírussal kezelt egereket kezeltek, és vizsgálták a lignán jótekonny hatását. Az arctigeninnel való kezelés hatására az összes vírussal kezelt egér túlélte, míg a fertőzött, de nem kezelt egerek nem éltek túl a fertőzést. Az arctigenin hatásmechanizmusát vizsgálták, és megállapították, hogy az csökkentette a vírussejtek számát az agyban, az immunohisztokémiás eredmények alapján bizonyították, hogy a kaszpáz-3-pozitív sejtek száma szignifikánsan csökkent, az antioxidáns hatásának köszönhetően kevesebb idegsejt pusztult el, mivel a szuperoxid-diszmutáz enzim szint megemelkedett és a NO szintje pedig lecsökkent, továbbá csökkentette a stressz hatására aktiválódó szignálfehérjék mennyiségét is. Az arctigeninnek önmagában (kontroll) semmilyen hatása nem volt az állatok viselkedésére.

Tsai és munkatársai (2011) az arctigenin gátló hatását vizsgálták a humán T-sejt proliferációra anti-CD3/CD28 monoklonális antitest aktiválást követően. Azonban az arctigeninnek ez a koncentrációfüggő gátló hatása nem a közvetlen toxicitásának volt köszönhető, ugyanis az arctigenin gátolta az interleukin-2 és interferon-képződést, továbbá csökkentette az interleukin-2 és interferon- génexpressziót is. Az arctigenin megakadályozza a leukociták toborzását a gyulladt szövetben.

Vlietinck és kutatócsoportja (1998) olyan természetes hatóanyagokat (pl. flavonoidokat, lignánokat) vizsgált, amelyek hatásosak lehetnek HIV vírusfertőzés ellen. Az arctigeninről és analógjairól megállapították, hogy az a vírus DNS integrációját akadályozza meg. Ezzel szemben Schröderék (1990) azt tapasztalták, hogy az arctigenin virális fehérjék expresszióját, a reverz transzkriptáz enzim működésének gátlását, illetve a topoizomeráz II gátlását idézte elő. Megállapításuk szerint azonban az arctigenin glikozidos formája, az arctiin hatástalanul bizonyult.

Az arctigeninnek gyógyszerként való törzskönyvezése felé is történtek lépések. Említést érdemel, hogy japán kutatók az arctigeninből szintézissel módosított terméket szabadalmaztattak antitumor szerként (Kitarou és mtsai 1989a), kardiotonikumként (Kitarou és mtsai 1989b) és immunosuppresszív szerként (Kitarou és mtsai 1989c), melynél már a gyógyszeradagolás módja is meghatározott.

A matairesinol, mint az arctigenin közvetlen előanyaga (3. ábra), gyógyászati szempontból szintén fontos molekula. Védő funkciója van mell- és prosztata rák, valamint érrendszeri betegségekkel szemben (Wang 2002, Clavel és mtsai 2006).

Ishida és munkatársai (2001) *Symplocos setchuensis* szárának etanolos kivonatából izolálták a matairesinolt. A H9 limfocita sejtekkel végzett kísérletekben a matairesinolt, mint anti-HIV molekulát azonosították, a vírusreplikáció gátlása miatt. Ezen felül jelentős antioxidatív tulajdonságáról is beszámoltak (Yamauchi és mtsai 2006).

A matairesinol kapcsán meg kell említeni, hogy a növényi eredetű fitoösztrogének szerkezetükben hasonlítanak az emlős ösztrogénekhez. A lignánok, mint a fitoösztrogének egyik csoportja, a bélbaktériumok közvetítésével úgynevezett emlős lignánokká alakulnak át. Kimutatták, hogy a bélbaktériumok közül az *Eubacterium* sp. ARC-2, *E. limosum* és *Peptostreptococcus* sp. demetiláló és dehidroxiláló hatása révén a secoizolariciresinol enterodiollá, majd enterolaktonná, míg a matairesinol enterolaktonná alakul át (Jin és mtsai. 2007, Lampe és mtsai. 2006). Ezek a lignánok fitoösztrogén hatásuk miatt gátolják a hormonfüggő daganatok kialakulását (van der Schouw és mtsai. 2000, Yang és mtsai. 2001, Potter és mtsai. 2002, Saarinen és mtsai. 2005). További enterolignán prekursor lehet a lariciresinol is (Milder és mtsai. 2005). Milder és munkatársai (2005) kimutatták, hogy egy holland populáción végzett kísérlet alapján a lariciresinol a napi összlignán bevitelnek átlagosan 75%-át, míg a matairesinol és a secoizolariciresinol csak a 25%-át adja, ezzel igazolva, hogy az epidemiológiai vizsgálatoknál számításba kell venni mind a négy lignánt, mint enterolignán prekuzort. Ezzel teljesebb képet kaphatunk a lignán bevitel, és krónikus betegségek közötti összefüggésről. Az emberi táplálékban a lignánok legfőbb forrásai az olajos magvak (len és szezám, napraforgó), bogyós gyümölcsök, hüvelyesek és a teljes kiőrlésű gabonafélék, a káposztafélék és egyes italok (kávé, tea), ezek fogyasztása javasolt (Lampe és mtsai 2006).

2008-ban Bloedon és munkatársai egy kettős-vak, randomizált, kontrollált klinikai vizsgálat keretein belül vizsgálták a lenmag (*Linum sp.*) fogyasztást, amely többek között alfa

linolénsavat, omega-3-zsírsavat, rostot és lignánokat is tartalmaz, és a szív- és érrendszeri kockázati tényezők közötti összefüggést. Sajnálatos módon azt tapasztalták, hogy a lenmagnak szerény, és rövid életű hatása volt az alacsony denzitású lipoprotein koleszterin (LDL-C) szintjére, viszont csökkentette a lipoprotein-a szintet, és javította az inzulin érzékenységet hiperlipidémiás (magas vérzsírú) felnőtteknél.

A trachelogenin gyógyászati hatását igazoló irodalom kevésbé kiterjedt, mint az eddig ismertetett lignánoké. Seal és munkatársai (2011) a trachelogenin kötődését vizsgálták a HIV-1 reverz transzkriptáz molekulához. Mivel a lignán úgy kötődött a fehérjéhez, hogy magas volt a kötési energiája és a hatékonysága, valamint semmilyen rákkeltő és mutagén mellékhatását nem tapasztalták, a kutatók a HIV-1 elleni gyógyszerkutatás egy lehetséges kiindulópontjaként jelölték meg.

## **II.5. Glikozidok és aglikonok *in vivo*: a növényi $\beta$ -glikozidáz enzim**

Ismert, hogy a növényekben a lignánokat két formában termelődnek, glikozidos, és aglikonos. A növények a lignánokat legnagyobb mennyiségben glikozidos formában tárolják. Mivel azonban az aglikonos forma a biológiailag aktívabb (Kang és mtsai. 2007, Yoo és mtsai. 2010), a növénynek a patogénnel szembeni hatékony védekezés érdekében a glükóz molekulát el kell hidrolizálnia a glikozidos formáról. A  $\beta$ -glikozidáz enzimek az oligoszacharidok között lévő  $\beta$ -glikozos kötést, illetve egy glükóz molekula és egy aril vagy akril aglikon között képes hasítani.

A növényi  $\beta$ -glikozidáz enzimek nagyban különböznek egymástól, ami az aglikon specificitásukat illeti, egyesek csak szűk tartományban érzékenyek (Selmar és mtsai. 1987, Hösel és Conn 1982). A  $\beta$ -glikozidázok fontos szerepet játszanak a patogénnel szembeni növényi védekezésben egyes hidroxámsavak, kumarinok, terpének, cianátok, vagy akár lignánok felszabadításával (Poulton 1990, és Oxtoby és mtsai. 1991), a konjugált növényi hormonok felszabadításában is szerepet játszanak, pl. gibberelin, ABA, auxin, citokinin glikozidok (Schliemann 1984, Brzobohaty és mtsai. 1993).

Dayan és munkatársai (2003) a *Podophyllum peltatum* növényben található podophyllotoxinra specifikus  $\beta$ -glikozidáz enzimről számoltak be. Az enzim szubsztrátspecifikusnak mutatkozott, mellyel megnövekedett mértékű podophyllotoxint lehetett előállítani.

## **II.6. Kémiai analízis**

### **II.6.1. Extrakció**

A *Centaurea* fajokban található dibenzilbutirolakton lignánok meghatározása irányuló cikkek többsége az irodalomban nem mennyiségi, hanem csak minőségi információval szolgálnak. Többségében hexános Soxhlet-kivonás után azonosítják a hatóanyagokat (Cooper és mtsai 2002, Ferguson és mtsai 2003, Shoeb és mtsai 2004a, 2007a). A Soxhlet készülékben a forralás során elpárolgó oldószer vonja ki a hatóanyagot a növényi mintákból nagy hatékonysággal, viszonylag hosszú időt igénybe véve, ám ez a módszer mennyiségi meghatározásra nem alkalmas.

Más fajokban az általánosan alkalmazott kivonószerek közül az etanol és metanolt alkalmazták az extrakciók során a kutatók (Rahman és mtsai 1990b, Li és mtsai 2005), mivel a lignánok többsége közepesen poláros molekula. A kivonó elegyek polaritásának a mértékét módosították az alkoholok hígításával (Willför és mtsai 2006).

A hagyományosan alkalmazott kivonási módszert, a refluxálást lignánok kivonására már 1984-ben alkalmazták (Kitagawa és mtsai. 1984). Egészen napjainkig (Guo és mtsai. 2007) használják ezt a kis eszközigényű módszert, amellyel egyszerre sok mintából történik meg a hatóanyag kivonás, könnyen és hatékonyan, ezért munkánk során mi is ezt a módszert alkalmaztuk.

### **II.6.2 Minőségi meghatározás**

Az általunk vizsgált növényekben található dibenzilbutirolakton lignánok minőségi meghatározásához a kiindulási minta a legtöbb esetben a növény termése (Cooper és mtsai. 2002, Ferguson és mtsai. 2003, Middleton és mtsai. 2003, Shoeb és mtsai. 2004, 2006, 2007), de a kutatások egy kisebb hányadában a fajok leveles hajtásaiból vontak ki lignánokat (Christensen és Lam 1991, Ribeiro és mtsai. 2002, Celik és mtsai. 2006, Djeddi és mtsai. 2008) ugyan ebből a célból.

A *Cynareae* nemzetség csoportba tartozó egyes fajokban a kutatók ki tudták mutatni az általunk is vizsgált lignán glikozid/aglikon párokat, viszont munkájuk során mennyiségi meghatározást nem végeztek (3. Táblázat). Mi azonban, ahol lehetséges volt, a rendelkezésre álló adatokból kiszámoltuk a lignánok mennyiségét is a jobb összehasonlíthatóság érdekében.

3. Táblázat A *Cynareae* nemzetség csoportba tartozó fajokban a dibezilbutirolakton-típusú lignánok előfordulása

| Lignán         | Fajok                            | Koncentrációk* | Hivatkozások              |
|----------------|----------------------------------|----------------|---------------------------|
| arctiin        | <b><i>Arctium lappa</i></b>      | 10,3           | Liu és mtsai. 2010        |
|                |                                  | <b>14,6</b>    | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Arctium leiospermum</i>       | n.k.           | Yakhontova és mtsai. 1971 |
|                | <i>Centaurea americana</i>       | 1,78           | Cooper és mtsai. 2002     |
|                | <i>Centaurea dealbata</i>        | 0,37           | Shoeb és mtsai. 2006      |
|                | <i>Centaurea macrocephala</i>    | 0,67           | Shoeb és mtsai. 2004b     |
|                | <i>Centaurea nigra</i>           | 0,99           | Middleton és mtsai. 2003  |
|                | <i>Centaurea schischkinii</i>    | 0,14           | Shoeb és mtsai. 2005      |
|                | <i>Centaurea sclerolepis</i>     | 3,00           | Erdemgill és mtsai. 2006  |
|                | <i>Cirsium oleraceum</i>         | 7,3            | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Cirsium palustre</i>          | 5,4            | Boldizsár és mtsai. 2010b |
| matairesinosid | <i>Arctium lappa</i>             | 0,23           | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Centaurea americana</i>       | 0,069          | Cooper és mtsai. 2002     |
|                | <i>Centaurea dealbata</i>        | 0,027          | Shoeb és mtsai. 2006      |
|                | <i>Centaurea nigra</i>           | 0,015          | Middleton és mtsai. 2003  |
|                | <i>Centaurea macrocephala</i>    | 0,012          | Shoeb és mtsai. 2004b     |
|                | <b><i>Centaurea scabiosa</i></b> | <b>8,1</b>     | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Centaurea scabiosa</i>        | 0,31           | Ferguson és mtsai. 2003   |
|                | <i>Centaurea schischkinii</i>    | 1,30           | Shoeb és mtsai. 2005      |
|                | <i>Centaurea sclerolepis</i>     | 0,14           | Erdemgil és mtsai. 2006   |
| trahelosid     | <b><i>Cirsium arvense</i></b>    | <b>2,61</b>    | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Cirsium canum</i>             | 1,70           | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Leuzea carthamoides</i>       | 1,09           | Harmatha és mtsai. 2007   |
| arctigenin     | <i>Arctium lappa</i>             | 0,75           | Liu és mtsai. 2010        |
|                |                                  | 0,67           | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Centaurea dealbata</i>        | 0,022          | Shoeb és mtsai. 2006      |
|                | <i>Centaurea nigra</i>           | 0,16           | Middleton és mtsai. 2003  |
|                | <i>Centaurea scabiosa</i>        | 0,067          | Ferguson és mtsai. 2003   |
|                | <i>Cirsium oleraceum</i>         | 0,30           | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Cirsium palustre</i>          | 0,19           | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Cynara cardunculus</i>        | n.k.           | Koubaa és mtsai. 1999     |
| matairesinol   | <i>Arctium lappa</i>             | 0,22           | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Carthamus tinctorius</i>      | n.k.           | Sakakibara és mtsai. 2007 |
|                | <i>Centaurea macrocephala</i>    | 0,091          | Shoeb és mtsai. 2004b     |
|                | <i>Centaurea nigra</i>           | 0,47           | Middleton és mtsai. 2003  |
|                | <i>Centaurea scabiosa</i>        | 0,34           | Ferguson és mtsai. 2003   |
|                | <i>Centaurea scabiosa</i>        | 1,80           | Boldizsár és mtsai. 2010a |
|                | <i>Centaurea schischkinii</i>    | 0,11           | Shoeb és mtsai. 2005      |
|                | <i>Carthamus tinctorius</i>      | n.k.           | Sakakibara és mtsai. 2007 |
| trahelogenin   | <i>Cirsium arvense</i>           | 0,23           | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Cirsium canum</i>             | 0,026          | Boldizsár és mtsai. 2010b |
|                | <i>Leuzea carthamoides</i>       | 0,83           | Harmatha és mtsai. 2007   |

Magyarázat: \*száraz termésre vonatkoztatott számítás, mmol/100g-ra kifejezve saját számolások alapján

Általánosságban elmondható, hogy a lignánok esetén a fordított fázisú HPLC esetén vivőelegyként inkább a vizes oldat és acetonitril elegyét alkalmazták a víz-metanol eleggyel szemben, mivel a kromatogramokon megjelenő csúcsok jobban elkülönültek. Az UV detektálás szelektivitása és érzékenysége általában elegendő a lignánok mennyiségi meghatározáshoz, viszont a kis mennyiségben előforduló lignánok méréséhez már másféle detektálási módszer (például MS) alkalmazása is szükséges (Choi és mtsai. 2003). Az MS detektálás alkalmazása megnöveli a vizsgálatok pontosságát és megbízhatóságát.

## **II.7. Az *Arctium lappa*, a *Centaurea* fajok és a *Cirsium arvense* kémiai leírása**

Hegnauer 1962-ben megjelent Chemotaxonomie című könyvében a *Cyanrae* (vagy *Cardueae*) nemzetség csoportba 5 alnemzetség csoportot sorolt be, ezek a *Carduinae*, *Centaureinae*, *Carlininae*, a *Cardopatiinae*, és az *Echinopsinae*. Ezek közül csak két alnemzetség csoport nem tartalmaz lignánokat, mégpedig a *Carlininae* és az *Echinopsidinae*. A többi csoportból irodalmi adatok alapján, illetve a rendelkezésre állási lehetőségek alapján választottuk ki az *Arctium lappa*-t, 11 *Centaurea* fajt és a *Cirsium arvense*-t.

Az *Arctium lappa* gyom- és ártéri társulásokban gyakori faj, hatóanyagainak köszönhetően szerepel a faj gyökere a Magyar nemzeti szabványok gyógynövény- és drogjegyzékében, *Bardanae radix* néven, de hazánkon kívül Európa számos országában is alkalmazzák gyógynövényként (EMA/HMPC/246764/2009). A gyökér anyagcsere termékei között megtalálható az inulin, nyálka illóolaj, poli- és kéntartalmú acetilének, polifenolok, lignánok és a szterinek. A hatóanyagok vizsgálata során a termésében az arctiint, az arctigenint és a diarctigenint azonosították (Byung Hoon és mtsai. 1994). Az arctiin és az arctigenin mennyiségét Liu és munkatársai meg is határozták (2010). Ferracane és munkatársai (2010) a faj magjában klorogén savat, kávé savat, cinarint, lappaolt (A, C és F), arctigenint, arctiint és matairesinolt mértek. A növény többi szervében is hasonló komponenseket azonosítottak, a gyökérben klorogén savat, kávé savat, cinarint, kvercitrint, arctiint, kvercetint és luteolint, a levelében klorogén savat, kávé savat, cinarint, kvercitrint, arctiint, kvercetint, rutint és luteolint mértek.

A *Centaurea* nemzetségbe körülbelül 300-350 faj tartozik, ebből 221 őshonos Európában (Tutin és mtsai. 1976), és 22 hazánkban (Simon, 2004).

A *Centaurea* fajok kedvező hatóanyag-tartalma (lignánok, flavonoidok, poliacetilének, zsírsavak, alkaloidok stb.) régóta ismert (Mothana és mtsai. 2010; Kumarasamy és mtsai. 2002; Cansaran és mtsai. 2010), illetve tartalmazznak többek között fenoloidokat (Nowak és mtsai. 1984), alkaloidokat (Shoeb és mtsai. 2006; Middleton és mtsai. 2003), és azotoid vegyületeket (Li és mtsai. 2010) is. A poliketidek közül különböző zsírsavakat tartalmazznak (Zengin és mtsai. 2011). Fitoekdiszteronokat (Shoeb és mtsai. 2006), szeszkviterpén laktonokat, és a triterpének közé tartozó lupeolt és betulint (Flamini és mtsai. 2004) is tartalmazznak, amelyek terpenoid vegyületek.

A lignánok azonosítása céljából elsősorban a terméseket vizsgálták. Ezek alapján arctiint találtak a *C. americana* (Cooper és mtsai. 2002; Shoeb és mtsai. 2006), *C. macrocephala* (Shoeb és mtsai. 2004b), *C. nigra* (Middleton és mtsai. 2003) és a *C. schischkinii* (Shoeb és mtsai. 2005) fajokban. Arctigenint a *C. americana* (Shoeb és mtsai. 2006), *C. nigra* (Middleton és mtsai. 2003), *C. scabiosa* (Ferguson és mtsai. 2003) és *C. schischkinii* (Shoeb és mtsai. 2005) fajok; matairesinolt és matairesinosidot a *C. americana* (Shoeb és mtsai. 2006), *C. macrocephala* (Shoeb és mtsai. 2004b), *C. nigra* (Middleton és mtsai. 2003), *C. scabiosa* (Ferguson és mtsai. 2003), *C. schischkinii* (Shoeb és mtsai. 2005) fajok tartalmazznak.

A kutatások másik részében a leveles hajtást vizsgálták. Itt arctiint a *C. isaurica* (Flamini és mtsai. 2004) és a *C. sphaerocephala* (Bastos és mtsai. 1990) fajokban találtak. Arctigenint szinte minden vizsgált fajból, matairesinolt a *C. affinis* (Janačković és mtsai. 2004), *C. ptosimopappa* (Çelik és mtsai. 2006), *C. scoparia* (Youssef & Frahm, 1995), *C. solstitialis* (Bruno és mtsai. 1991), *C. sphaerocephala* (Bastos és mtsai. 1990) és *C. tweediei* (Fortuna és mtsai. 2001) fajokból izoláltak. Matairesinosidot eddig nem sikerült leveles hajtásból kimutatni.

A nemzetségbe tartozó fajokat igen szűk körben alkalmazzák a népgyógyászatban, pl. szemgyulladás (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*), láz (*C. cyanus*, *C. jacea*, *C. solstitialis*), nőgyógyászati problémák (*C. cyanus*), emésztési zavarok (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*), valamint sebek kezelésére (*C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. jacea*) (Csupor és mtsai. 2010). A *C. adjarica* az irodalomban kevésbé ismert faj, ez idáig csak gyulladáscsökkentő hatásáról számoltak be (Csupor és mtsai. 2012).

A magyar népgyógyászatban a leggyakrabban alkalmazott faj a *C. cyanus*, feltehetően széles körű elterjedésének okán. Fitokémiai és farmakológiai szempontból a *Centaurea* fajokat kevésbé elemezték.



A *Cirsium* fajok, amelyek szintén gyomnövények, nagy mennyiségben tartalmaznak flavonoidokat, és trachelosid/trachelogenin, illetve arctiin/arctigenin lignánokat (Jordon-Thaden és Louda 2003, Boldizsár és mtsai. 2010b).

## **II.8. A lignánok mennyiségi és minőségi változása a termés érése során**

Ismert, hogy egyes növények terméseiben az érés során olyan hatóanyagok halmozódnak fel, amelyek az éretlen termésben nem, vagy csak nagyon kis mennyiségben vannak jelen. Ezt a jelenséget figyelhetjük meg pl. a meggy termésének érése során, amikor antocianinok folyamatosan halmozódnak fel nagy mennyiségben (Serrano és mtsai. 2005).

Dános 2007-ben a *Silybum marianum*, máriatövis, növénnyel végzett vizsgálatai során megállapította, hogy a májvédő, citoprotektív hatású flavonolignánok csak a fejlődő és érett kaszattermésekben találhatók meg. A növény testtájai közül a flavonolignán komponensek képzése, ill. felhalmozása kizárólag a generatív részekben következik be. A vegetatív testtájakban ellenben flavonoidok széles skálája található meg. A termés szövettájai körül hatóanyagot a jelentős változáson átesett termésfal és fásodott (lignifikálódott) maghéj tartalmazza, a magfehérje- és embrió csak nyomokban. Megállapította továbbá, hogy az egyedfejlődés alatt – virágzástól termésérésig követve a termő terméssé, ill. maggá szerveződését – a flavonolignánok biogenezise és felhalmozása a maghéj fásodásával van korrelációban. A rentábilis hatóanyagkinyerés a kemény héj hántolása révén történhet meg.

## **II.9. *Centaurea* fajok *in vitro* szövettenyésztete**

Az eddigiekben felsorolt kutatások mind leveles hajtások, ill. termések lignántartalmáról szólnak, a *Centaurea* fajok *in vitro* kutatásáról kevés irodalmi adat szól. Csupán néhány *Centaurea* fajból hoztak létre sejt- ill szövettenyészeteket, és ezek a kutatások sem a hatóanyagtermeléshez kapcsolódnak.

A *C. calcitrapa* *Agrobacterium*-mal transzformált hairy root tenyészetét a sajtgyártáshoz szükséges kenprozin termeltetésére hozták létre. A kenprozin az aszpartil proteázok közé tartozik, a sajtgyártás során tejoltóként alkalmazható a kóser és vegetáriánus sajtok elkészítéséhez (így a 3-4 hetes borjú bendőjében élő *Lactococcus* törzsek chymozin exoenzimjét helyettesítik) (Loureço és mtsai. 2002). Raposo és Lima-Costa (2006) a bioreaktorokban tenyésztett *C. calcitrapa* szuszpenziós kultúrák megfelelő hozamát kialakító fermentációtechnikai körülményeket ismertette.

Kakegawa és munkatársai (1987, 1991) *C. cyanus* sejtszuszpenziókat hozták létre antocianin termelés tanulmányozására. Megállapították, hogy a sötétben nevelt szuszpenziókban UV és fehér fényű megvilágítás hatására a PAL, kalcion szintáz, kalcion izomeráz enzimek aktivitása emelkedett és cyanidin, cyanidin-3-glucoside és cyanidin-3-(6"-malonylglucoside) szintézis indult be. Később az antociánok UV-B és UV-C elleni védő funkcióját bizonyították *C. cyanus* sejtenyészeteken (Takahashi és mtsai. 1991).

A *C. ragusina* Horvátország száraz, szikes területein honos. A kutatók arra keresték a választ, hogy milyen speciális enzimmechanizmusok segítségével alkalmazkodott a növény ehhez a környezethez. A sóstressz másodlagos stresszhatásokon keresztül is károsítja a növényi szervezeteket. Ilyen például a reaktív oxigéngyökök megjelenése; a növény ez ellen különféle antioxidánsokkal és antioxidatív enzimekkel védekezik (Radić és Pevalek-Kozlina 2010). Hosszú ideig fenntartott tenyészeiken vizsgálták genetikai stabilitását is, és igen stabil tenyészeknek bizonyultak. A hosszú távú tenyésztésnek nem volt degradatív hatása, a 94. szubkultúra is csak a friss csíranövényekével azonos szintű mitotikus aberrációt mutatott (Radić és mtsai. 2005).

Az Egyesült Államokban invazív gyomnak számító *C. solstitialis* megfékezésére alkalmas gombafajt kerestek. Intakt növényen, kallusz- és szuszpenziós kultúrákon vizsgálták gombatoxinok, patogén és nem patogén gombák hatását (Vidal és mtsai. 2004).

A veszélyeztetett fajok megóvásának lehetőségét több kutató is a mikroszaporításban látja. Spanyolország északnyugati részén honos *C. ultreiae* az ország egyik endemikus növénye, de az élőhelyek degradációja és a kevésbé hatékony védelem miatt egyre csökken az egyedszáma. Mallón és munkatársai (2010) ezért hajtásdarabokból indított tenyészeteken a különböző vitaminok és hormonok differenciációra gyakorolt hatását vizsgálták. Kidolgoztak egy citológiai és molekuláris eljárást az *in vitro* nevelt növények genetikai stabilitásának becslésére. Az észak-spanyolországi *C. paui* (Cuenca és mtsai. 1999) és *C. spachii* (Cuenca és Amo-Marco 2000), a horvátországi *C. ragusina* (Pevalek-Kozlina 1998), a balkáni endemikus *C. rupestris* (Perica 2003), a törökországi *C. thihatcheffii* (Ozel és mtsai. 2006) fajokra is létezik kidolgozott mikroszaporítási protokoll.

Más fajokat, nem ritkaságuk okán, hanem gazdasági hasznuk miatt mikroszaporítanak. A *C. macrocephala* (Hosoki és Kimura 1997) és *C. montana* (Abou és mtsai. 2012) fajokat díszes virágaikért kedvelik. Egy-egy szép virágú példány klónvonalainak fenntartásáért hozták létre a tenyészeteket.

## **II.10. A hatóanyagtermelés és az organogenezis összefüggései**

A gyógynövény- és drogismeret már bizonyította a gyógyszeripar felé, hogy a régóta alkalmazott (gyógy)növényekből származó hatóanyagok óriási lehetőséget kínálnak új gyógyszerek kifejlesztésében (Phillipson 2007). Afrikában például a mai napig az emberek többsége az ismert gyógynövényeket használja, hogy a betegségekből meggyógyuljanak, mivel ezek megfizethetőek, biztonságos a fogyasztásuk, könnyen hozzáférhetőek, és mivel régóta alkalmazzák, a róluk szóló ismeretek kiterjedtek (Vermani és Garg 2002). A betegségek gyógyulásáért felelős növényi hatóanyagok a növények különböző szerveiben találhatóak, úgy, mint a gyökérben, levélben, szárban, virágban, termésben, vagy a fás szárú növények fakérgében. A növényi alapanyag általában természetes populációk, vagy termesztett növények betakarításával válik hozzáférhetővé. Azonban a különböző földrajzi élőhelyről származó növények kémiai és genetikai variabilitása megnehezíti a kereskedelmi forgalomba bevezetett termékegységesítést. Következésképpen, a biotechnológusok az alternatív növényi sejt-, szövet- és szervkultúrákat hoztak létre, és kezdték el használni, hogy ellenőrzött körülmények között tudják termelni a növényi hatóanyagokat, amelyek megfelelnek a kereskedelmi igényeknek.

Egyre több gyógyszeripari résztvevő fejleszt poliphenol tartalmú, növényi eredetű termékeket. Mindazonáltal e vegyületekből a természetben nem áll rendelkezésre elegendő mennyiség, a növények kis csoportjában kis mennyiségben találhatóak, továbbá a populációk életképességét külső körülmények is befolyásolják, úgy, mint az éghajlat, a talaj minősége és a kártevők (Buitelaar és Tramper 1992). A növények lassú növekedése és a hatóanyag sikertelen kinyerése, tiszta formában, mind hozzájárul, hogy nehéz elegendő mennyiségben ezekhez a vegyületcsoportokhoz hozzájutni (Balandrin és mtsai. 1985). Jelenleg is folynak erőfeszítések, hogy ezeket a másodlagos anyagcsere vegyületeket szerves szintézissel előállítsák. Ezek az aktív vegyületek azonban általában igen komplexek, és sok esetben szintézis útján előállíthatatlanok, vagy a hozam túl alacsony. A nehézségek leküzdésére növényi szövetkultúrákat hoztak létre melyek gyors, nagy léptékű sejt- és másodlagos anyagcseretermék termelést tesz lehetővé (Hirose és mtsai. 1990). Ideális lenne egy olyan különböző szervek előállítását célzó kallusz-indukált rendszer előállítása, amely hatékonyá tehetné e vegyületek tömegtermelését.

Jól ismert, hogy a különböző külső környezeti tényezők, úgy, mint a hőmérséklet, a fény, a pH, és a só koncentráció befolyásolják a másodlagos anyagcseretermékek képződését (Smetanska 2008). A növény saját, belső növekedését szabályozó faktorai is fontos szerepet

játszanak, nemcsak a szöveti sejtvonal növekedésben, de a biológiailag aktív vegyületek termelésében is. Az auxinok (IAA, NAA, és a 2,4-D) és a citokininek (benzyladenin, kinetin, és a zeatin) a legfontosabb belső növekedést szabályozó faktorok a növényi szövetkultúrákban. Nemcsak az auxin és citokinin aránya fontos a kallusz növekedésében és hatóanyag termelésében, hanem e kettő aránya is. Ebben az értelemben a növényi szabályozó anyagok kiválasztása, és optimális koncentrációjának kiválasztása fontos lépés az anyagcseretermékek termeltetésének javításában (Lee és mtsai. 2011).

A másodlagos anyagcseretermékek termeltetése növényi szövettenyészetekben függ a sejtek szaporodásától és differenciációjától (George és mtsai. 2008). A szövetkultúrák növekedése és a felhalmozódó vegyületek mennyisége függ a növekedésszabályozók mennyiségétől (Deus és Zenk 1982). Például a külső magas auxin koncentráció sejtosztódást és növekedést eredményez, míg a másodlagos anyagcseretermékek szintézisét ellenkező irányban befolyásolja, csökkenti (Lee és mtsai. 2011). Különböző anyagcseretermékek eltérő mértékben halmozódnak fel a növények növekedési és fejlődési fázisaiban.

Hatékony *in vitro* növényregeneráló módszerek léteznek például a *Lessertia frutescens* L. növényben található L-canavanin előállítására. Shaik és munkatársai (2011) laboratóriumukban igazolták, hogy a növény hatóanyaga magasabb koncentrációban volt jelen az *in vitro* levelek kivonataiban, mint az intakt növény levelében vagy termésében. Több kutató is beszámolt már a biológiailag aktív vegyületek nagyobb hozamáról gyógynövények *in vitro* regenerált leveleiben (Rathore és Shekhawat 2009, Jain és mtsai. 2011).

### III. CÉLKITŰZÉSEK

- 1) Mivel a szakirodalmi adatok egyértelműen azt mutatták, hogy a dibenzilbutirolakton típusú lignánok gyógyszeripari szempontból fontos vegyületek, és szintetikus előállításuk többnyire nincs megoldva, valamint igen költséges, munkánk első részében olyan természetes növényi anyagokat kerestünk, amelyek ígéretesnek tűntek lignánok kinyerésére és termeltetésére. Korábbi közlések alapján az *Arctium lappa*, *Cirsium arvense*, *Centaurea scabiosa*, és további 10 *Centaurea* faj érett terméseire terjesztettük ki vizsgálatainkat. A lignánok azonosítását, mennyiségi meghatározására, szétválasztására HPLC-UV, és HPLC-ESPI-MS módszereket terveztünk használni.
- 2) Azonosítani kívántuk, hogy a termés (mag) melyik része tartalmazza a legnagyobb mennyiségben a lignánokat, illetve a termésérés és a csírázás mely fázisaiban miként változik a lignánösszetétel, illetve a lignántartalom. Mivel az aglikon forma farmakológiai szempontból hatékonyabb, tanulmányozni kívántuk a lignán glikozidok hidrolíziséért felelős  $\beta$ -glikozidáz enzim natív előfordulását, illetve aktivitásának élettani körülményeit.
- 3) Munkánk második részében az előzőekben említett *Centaurea* fajokból terveztük sejtenyészetek, illetve sejtszuspenziós kultúrák létrehozását, amelyek segítségével a hatóanyag kinyerés gazdaságosan történik, és a tenyészet folyamatos növekedésével, differenciációjával a termeltetés hosszútávra megoldható.
- 4) Összefüggést kerestünk a kallusz kultúrák differenciálódása, és a különböző irányokban elkötelezett sejts csoportok lignánösszetétele, valamint lignántartalma között. A sejtek differenciálódásának nyomonkövetésére fénymikroszkópos, transzmissziós- és szkennning elektronmikroszkópos vizsgálatokat terveztünk a minták analitikai vizsgálatával párhuzamosan.

## IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### IV.1. Növényi minták

#### IV.1.1. Növényi minták

Vizsgálatainkban az alábbi növényfajokat használtuk:

- *Arctium lappa*
- *Cirsium arvense*
- *Centaurea*
  - *adjarica*
  - *americana*
  - *calcitrapa*
  - *cyanus*
  - *dealbata*
  - *jacea*
  - *montana*
  - *pannonica*
  - *scabiosa*
  - *solstitialis*
  - *triumfetti*

Kísérleteinkhez a fenti növények terméseit (*Arctium lappa*, *Cirsium arvense*, illetve valamennyi felsorolt *Centaurea* faj) vagy leveleit (valamennyi felsorolt *Centaurea* faj) használtuk. Az *Arctium lappa* érett, a *Cirsium arvense* éretlen, illetve érett terméseit 2009 szeptemberében gyűjtöttük a Budai Hegyekben. A *Centaurea* terméseket a B & T, World Seeds Sarl, Pagnignan, 34210 Aigues Vives, France cégtől vásároltuk 2009-ben, két faj kivételével, a *C. pannonica* és a *C. triumfetti* termései a Gyógynövénykutató Intézet Kft. Budakalászi Génbankjából kaptuk.

Minden esetben figyeltünk arra, hogy a minták gyűjtése véletlenszerűen kiválasztott egyedekről történjék, így elkerülve a mintavételből származó, a későbbi mérések során megjelenő eltéréseket. Termések esetében minimum 6 egyedről történt a begyűjtés, a leveleknél 3 egyedből fajonként. A terméseket szárazon, szobahőmérsékleten, fénytől elzárva

tartottuk. A leveleket 4 órán belül lefagyasztottuk majd liofilizáltuk annak érdekében, hogy megakadályozzuk a lebontó folyamatok elindulását és a lignánösszetétel esetleges változását.

#### **IV.1.2. A termésérés folyamata**

A termés érése során változó lignánmennyiség jellemzéséhez terméseket gyűjtöttünk több növényből egy azon növény virágzási és érett termés állapotából, melyet egy RS-1-től RS-4 értékű skálával jellemeztünk:

RS-1: teljes virágzás

RS-2: hervadó párta

RS-3: teljesen elfonnyadt, lehulló párta

RS-4: érett termés

Ezeket a mintákat is a IV.5.1. fejezetben leírt módszer szerint extraháltuk.

A lignán összetevők átalakulási (termésérés során lejátszódó változások) folyamatainak egyszerű összehasonlítására azok koncentrációját mmol/100 g (egy kérdéses összetevő millimól-ban megadott mennyisége 100 g szárított növényi mintában) értékben fejezzük ki. Így olyan nagyságrendű koncentrációértékeket kapunk, melyek egyszerűen összehasonlíthatóak egymással.

#### **IV.1.3. A csírázás folyamata**

A termésérés folyamatának vizsgálatához hasonlóan, a csírázás során változó lignánmennyiség vizsgálatához a csírázás folyamatát is 4 különböző állapotra osztottuk fel, melyeket a gyököcske méretével különböztettünk meg egymástól.

GS-1: érett termés

GS-2: gyököcske megjelenése

GS-3: gyököcske mérete megegyezik a termés méretével

GS-4: a termésfal és az embrió teljesen különválnak egymástól

Az érett terméseket (GS-1) Petri-csésze aljára helyezett nedves szűrőpapírra tettük, és szobahőmérsékleten, fénytől elzárva tartottuk, és az adott állapotnak megfelelően gyűjtöttük be a mintákat. Ezeket liofilizáltuk, és a IV.5.1 fejezetben leírtak szerint kivonatot készítettünk belőlük.

A lignán összetevők átalakulási (csírázás során lejátszódó változások) folyamatainak egyszerű összehasonlítására azok koncentrációját mmol/100 g (egy kérdéses összetevő

millimól-ban megadott mennyisége 100 g szárított növényi mintában) értékben fejezzük ki. Így olyan nagyságrendű koncentrációértékeket kapunk, amelyek egyszerűen összehasonlíthatóak egymással.

#### **IV.1.4. A kaszattermés részeinek szétválasztása**

A tanulmányozott kaszattermések termésfala a termésfalon belüli magot borító maghéjjal összenőve kemény, fásodott állományú réteget képez (Dános 2007). Ezt a réteget, ami a termésfal és a maghép együttese, az egyszerűség kedvéért a továbbiakban termésfalnak nevezzük. A termésfalon belüli mag teljes egészében a két jól fejlett sziklevelű embrióból áll. A termés részekre választásával, ami spontán a termés csírázásakor történik (lásd IV.9. fejezet), vagy a termés szikével való kettévágása után általunk kivitelezve történik meg, tehát a termés könnyen elkülöníthető részeinek, a termésfalnak és az embriónak a lignánösszetételét tudtuk vizsgálni.

#### **IV.2. Vegyszerek, reagensek**

Az arctigenin, matairesinol és matairesinol-glikozid standardok a Sigma cégtől származott (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA), az arctiint a BioSolutions Halle GmbH (Halle, Németország) cégtől vásároltuk. A munka során használt egyéb vegyszerek a Reanal cégtől származtak (Reanal Finomvegyszergyár ZRt. Budapest).

#### **IV.3. Növényi szövettenyésztés**

##### **IV.3.1. A különböző *Centaurea* fajok kallusztenyésztéseinek létrehozása és fenntartása**

A *Centaurea* fajok levél darabjait (10x10 mm), 20 (v/v) %-os nátrium-hipoklorit oldattal 5 percig majd 70 % (v/v) etil alkohollal 5-7 percig sterilizáltuk, ezután háromszor mostuk steril desztillált vízben. Ezt követően mindegyik *Centaurea* fajból három Petri csészébe helyeztünk mintákat, Petri csészénként hat levél darabot. Gamborg B5 szilárd táptalajt (0,5 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, 8 g l<sup>-1</sup> agar, 30 g l<sup>-1</sup> szacharóz) használtunk a kallusz indításához (Gamborg és mtsai. 1968; Függelék). A kallusz kultúrákat szobahőmérsékleten (20-25 °C) tartottuk fenn, kis intenzitású (10-20 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>), laborablakon átszűrődő, szórt természetes fényű megvilágítás mellett, amelynél a megvilágítási időtartam és intenzitás az évszakok és napszakok szerint változott. A Gamborg B5 táptalajon indukált kalluszokat szekunder



állapotuktól kezdve szilárd Murashige-Skoog táptalajon növesztettük tovább (Murashige és Skoog 1962; Függelék). A kalluszokat háromhetenkénti átoltással tartottuk fenn.

#### IV.3.2. A munkában használt táptalajok összetétele

Korábbi vizsgálataink alapján a sejtenyészet fenntartásához a Murashige-Skoog táptalaj hormon, cukor illetve ásványi anyag tartalmát változtattuk meg.

Irodalmi leírás alapján választottuk ki a táptalaj hormonösszetételét. Ennek során naftalinsavat (NAA), és egy fajta citokinint, kinetint alkalmaztunk (4. táblázat).

**4. táblázat** A táptalajok hormonösszetétele.

| Táptalaj változatok | Hormonok (mg l <sup>-1</sup> ) |       |         | Hivatkozások          |
|---------------------|--------------------------------|-------|---------|-----------------------|
|                     | NAA                            | 2,4-D | Kinetin |                       |
| B5                  |                                | 0,5   |         | Páska és mtsai 1999   |
| MSA                 | 2                              |       | 0,2     | Rahman és mtsai 1990b |

Korábbi vizsgálataink eredményeiből megállapítottuk, hogy az MSA táptalaj alkalmas a lignántermelő fajok kallusz kultúráinak hosszú távú fenntartására és lignántartalmának fokozására. Emiatt kísérleteinkben az MSA tápközeget alkalmaztuk. A táptalaj szacharóz mennyisége 30 g l<sup>-1</sup> volt.

#### IV.3.4. A sejkultúra biomassza növekedésének vizsgálata

A növekedési görbe elkészítéséhez egyforma mennyiségű innokulumot helyeztünk adott mennyiségű szilárd táptalajba a kísérlet elindításánál.

Növekedési görbét az előzetes vizsgálatok alapján legígéretesebbnek tűnő fajból, a *Centaurea adjarica*-ból indítottunk. E faj esetén 1,5 gramm kalluszt 50 ml szilárd MSA táptalajt tartalmazó Petri-csészébe (24 db) helyeztünk, amelyeket természetes fényen tartottunk fenn.

A növekedési görbe készítésénél 21 napon keresztül gyűjtöttük be a mintákat és vizsgáltuk az *in vitro* kultúra sejttömeg gyarapodását. A növekedési görbék adatait 3 naponként 3 Petri-csésze begyűjtésével kaptuk, amelyeket 50 ml szilárd tápközegre vonatkoztattunk. A kalluszok begyűjtésekor először a friss tömeget mértük meg, majd a növényi anyagot mélyhűtőbe helyeztük, hogy fagyasztás után liofilizáljuk (100 órán át)

(Jencons Freeze Dryer, Bedfordshire, Nagy-Britania), ezt követően állapítottuk meg a száraz tömeget.

#### **IV.4. Mikroszkópos vizsgálatok**

##### **IV.4.1. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a kallusz tenyészetek néhány mm átmérőjű aggregátumait, differenciált részeit alkalmaztuk mintaként, így biztosítva a fixálószer egyenletes és gyors penetrációját. A glutáraldehidben (2%, 3 óra) és ozmium-tetroxidban (1%, 2 óra) fixáltuk, 70 mM foszfát-puffert (pH 7,2) alkalmazva. A fixált anyagot etanol (25; 50; 70; 90; 96; 100 %) sorban dehidratáltuk. Ezt követően propilénoxidban, Durcupán ACM I. és propilénoxid keverékben, majd 16 órát Durcupán ACM I-ben inkubáltuk a fixált mintákat. Ezután Durcupán ACM II-be kerültek a minták, majd 2,5 napig 60 °C-on polimerizáltattuk a műgyantát. Az ultravékony (70 nm) metszeteket Reichert-Jung ULTRACUT E ultramikrotommal (Bécs, Ausztria) készítettük. A mintákat Hitachi 7100 TEM (Tokio, Japán) mikroszkóppal vizsgáltuk, 75 kV gyorsítófeszültség mellett.

##### **IV.4.2. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatok**

A kallusz tenyészetek differenciálódott részeiből származó mintákat 4%-os paraformaldehid oldatban fixáltuk 2 órán keresztül, a puffer 70 mM K-Na foszfát (pH=7.2) volt. A fixált anyagot etanol (25; 50; 70; 90; 96; 100 %) sorban dehidratáltuk, majd a mintákat amid-acetátba helyeztük, és kritikuspont szárítással kiszárítottuk. A növényi részeket aranybevonattal láttuk el, majd 15 kV gyorsító feszültség mellett, Hitachi S-2360 N pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk

##### **IV.4.3. Fénymikroszkópos és sztereomikroszkópos vizsgálatok**

Fénymikroszkóppal (Olympus BH-2-RFCA), illetve sztereomikroszkóppal (Nikon SMZ 10-A) felvételeket készítettünk a kallusz tenyészetekről. A fénymikroszkópos vizsgálatához a mintákat az elektronmikroszkópiával azonos metodikával ágyasztuk be, a metszetek vastagsága 1 µm volt.

##### **IV.4.4. A mikroszkópos minták értékelése**

A fajokból rendelkezésre álló tenyészetek feléből vettünk mintát beágyazás céljából mind az elektronmikroszkópos, mind a fénymikroszkópos felvételekhez. Egy mintából átlagosan 10 metszet készült. Felvétel a metszetek többségéről nem készült, mivel a metszési

eljárások során igen sok roncsolódott. Az elkészült felvételek a tenyészetek legjellemzőbb tulajdonságait mutatják be.

## **IV.5. Kémiai analízis**

### **IV.5.1. Lignán extrakció**

Minden esetben a növényi anyagot mélyhűtőbe helyeztük, majd  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on történő fagyasztás után liofilizáltuk, 5 napig (Jencons Freeze Dryer, Bedfordshire, Nagy-Britania). Az így kapott vízmentes mintákat dörzsmozsárban porítottuk el, majd 0,2 gramm tömegű részletét használtuk fel mindhárom kivonási módszernél.

A visszafolyós hűtő melletti forralásnál (Refluxálás) a mintát 1 órán át forraltuk 2 ml kivonószerben, 80 % (v/v) metanollal,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az oldhatatlan, lecentrifugált növényi anyagot másodjára is 2 ml oldószerrel extraháltuk, és hasonló módon (már csak 1 ml metanollal) a harmadik alkalommal. Így 5 ml összegyűjtött felülúszót kaptunk.

### **IV.5.2. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás ultraibolya spektrofotometriás (UV) és tömeg spektrometriás (MS) detektálással**

A lignánokat TSQ QuantumAMTriple Quadrupol Mass Spectrometer típusú, Thermo Finnigan gyártmányú (River Oaks Parkway, San Jose, CA, USA) készülékkel mértünk, amihez Surveyor MS pumpa, automata mintaadagoló és PDA5 detektor tartozik.

Az elválasztást GraceSmart RP18 ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ),  $150 \times 4.6\text{ mm}$  (Grace Davison Discovery Sciences Lokeren, Belgium) oszlopon végeztük. A következő oldószereket alkalmaztuk: eluens A=acetonitril:0.07M ecetsav 15:85 (v/v), eluens B=acetonitril:0.07M ecetsav 85:15 (v/v). Az alábbi gradiens program szerint vizsgáltuk a hatóanyagokat: 0 perc: 15% B, 5 perc: 30% B, 12 perc: 44% B, és 20 perc: 60% B. A mérés során az áramlási sebesség:  $1\text{ ml perc}^{-1}$  volt, az injektált mennyiség:  $20\text{ }\mu\text{l}$ . Az UV detektálás  $280\text{ nm}$ -en történt.

A mérés során az MS detektor paraméterei a következők voltak: elektropray ionizáció, pozitív ionmód,  $140\text{--}700\text{ m/z}$  tömegtartomány,  $\text{N}_2$  szárítógáz sebessége  $8\text{ l perc}^{-1}$ , a kapilláris feszültség  $3000\text{ V}$ , fragmentációs feszültség  $80\text{ V}$ , fragmentáló gázként Argont alkalmaztunk.

## **IV.6. Glikozidáz enzim hidrolízis**

A liofilizált, porított és homogenizált növényi mintákat ( $0,02\text{ g}$ ) szuszpendáltuk  $1\text{ ml}$  desztillált vízben. A szuszpenziókat  $40^{\circ}\text{C}$ -on  $200\text{ rpm}$  sebességgel kevertük egy mágneses

termosztát segítségével (Ikamag RH, Janke and Kunkel GmbH) 1 órán keresztül. Ezt követően a mintákat újból liofilizáltuk, és a IV.5.1. fejezetben leírt módszer szerint extraháltuk.

#### **IV.7. Savas hidrolízis**

A IV.5.1 fejezetben leírtak szerinti metanolos kivonat 0,10 ml térfogatú részletét rotációs vákuumbepárló segítségével 40-45 °C hőmérsékleten 4 ml térfogatú, jól zárható üveg tégelyben megszáritottuk. A száritott kivonathoz 0,20 ml térfogatú 2 mol l<sup>-1</sup> koncentrációjú trifluorecetsavat mértünk, majd a tégely bezárását követően 100 °C-on 1 órán át melegítettük. A hidrolízisidő leteltével a trifluorecetsavat rotációs vákuumbepárló segítségével 40-45 °C hőmérsékleten megszáritottuk. A száritott hidrolizátum adott térfogatú (0,10-5,0 ml) metil alkoholban (80% (v/v)) feloldott részletét (20 mikroliter) injektáltuk a HPLC-UV berendezésbe.

#### **IV.8. Az eredmények statisztikai értékelése**

Az adataink háromszori, egymástól független mérés eredményeinek az átlagai. Microsoft Excel programot használtuk az adataink feldolgozásához és a statisztikai értékek kiszámolásához (átlag, szórás, RSD% - relative standard deviation percentages), emellett a diagramok elkészítéséhez is. A minták jellegétől és a kísérletben alkalmazott módszertől függ, hogy mely RSD% illetve szórás értékeket tekinthetjük elfogadottnak az irodalomban. Az *Arctium*, *Cirsium* és *Centaurea* terméseknél a lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása esetén a 10 alatti RSD% az elfogadott (Choi és mtsai 2003).

Az intakt növényekéhez viszonyítva az *in vitro* tenyészetek esetében nagyobbak az irodalomban megjelölt szórás értékek vagy az eredményeket tág intervallumként közlik, és nem határoznak meg elkülönülten szórást (Schmitt és Petersen 2002).

## V. EREDMÉNYEK

### V.1.A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása

#### V.1.1. A lignánösszetétel folyadékkromatográfiás meghatározása

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa*, és a *Cirsium arvense* érett terméseiben megtalálható lignánok azonosítása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztásuk után tömegspektrometriás (MS) detektálással, és mennyiségi meghatározása ultraibolya spektrofotometriás (UV) detektálással történt. A vizsgálatokhoz mindhárom vizsgált faj esetében hidrolizálatlan (intakt), továbbá trifluorecetsavval és enzimatikusan (a növények saját  $\beta$ -glikozidáz enzimével) hidrolizált növényi kivonatokat használtunk fel. A lignánok azonosítását tömegspektrometriás adataik [melyek a korábbi irodalmi eredményekkel egyezők voltak (Sedlák és mtsai 2008, Boldizsár és mtsai 2010a, Boldizsár és mtsai 2010b)] mellett a beszerezhető standardokkal egyező retenciós idejük (arctiin, matairesinol, arctigenin) is bizonyították (4. ábra).

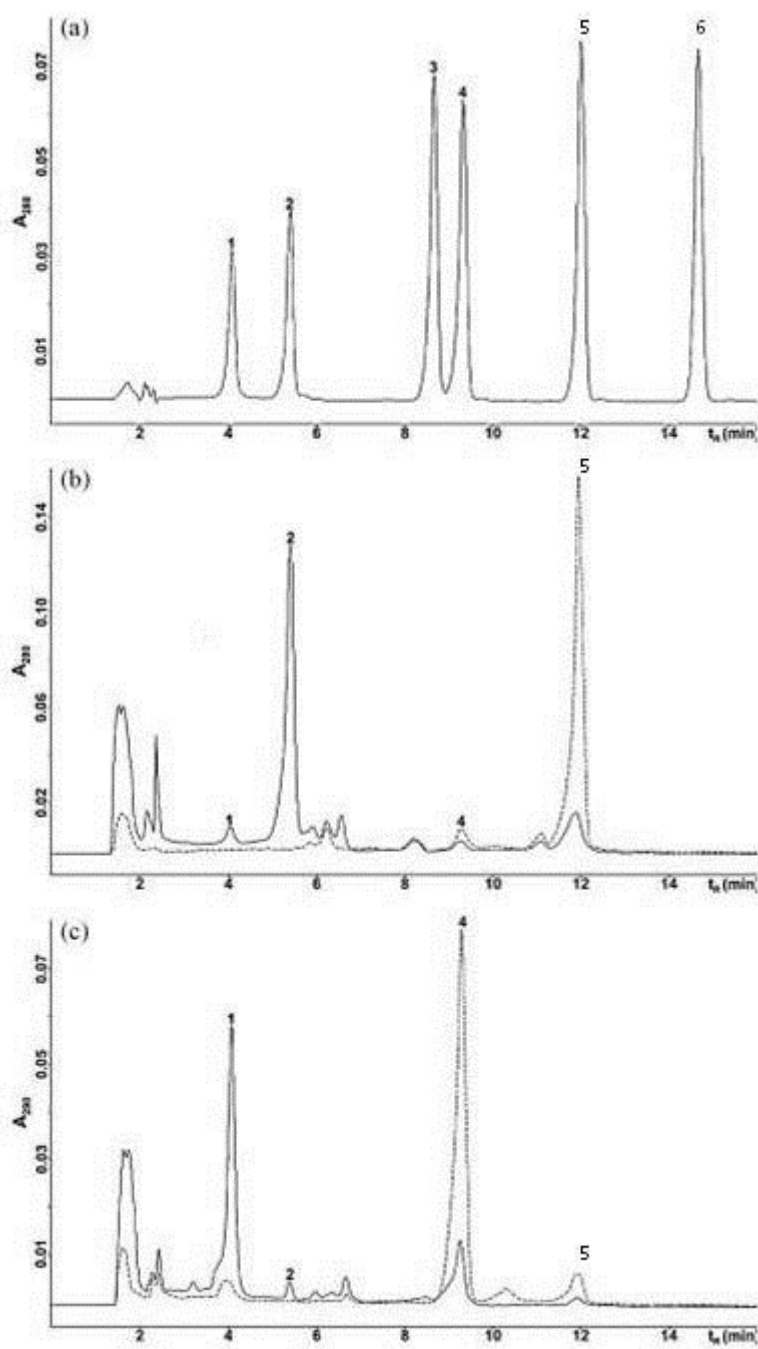
A HPLC-ESPI-MS vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy mindegyik lignán MS spektrumában

(a) a vízzel képzett addukt ionok ( $[M+H_2O]^+$ ) adták a legintenzívebb jelet;

(b) ezek mellett a protonált ( $[M+H]^+$ ) ionok, és

(c) a három glikozid (arctiin, matairesinosid és trachelosid) esetében pedig még a glükóz lehasadásával keletkezett és protonálódott aglikonokra (arctigenin, matairesinol és trachelosid) jellemző ionok adták a legnagyobb intenzitású jeleket. Ezek, a lignánok azonosítására egyértelműen jellemző ionok, a következők voltak:

1. Matairesinosid ( $M_w=520$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 538,3$ ;  $m/z [M-\text{glükóz}+H]^+ = 359,2$ ;
2. Arctiin ( $M_w=534$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 552,3$ ;  $m/z [M-\text{glükóz}+H]^+ = 373,2$
3. Trachelosid ( $M_w=550$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 568,0$ ;  $m/z [M-\text{glükóz}+H]^+ = 388,95$
4. Matairesinol ( $M_w=358$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 376,1$ ;  $m/z [M+H]^+ = 359,1$
5. Arctigenin ( $M_w=372$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 390,2$ ;  $m/z [M+H]^+ = 373,1$
6. Trachelogenin ( $M_w=388$ );  $m/z [M+H_2O]^+ = 406,0$ ;  $m/z [M+H]^+ = 389,0$



**4. ábra.** Lignán standardok (a), az *Arctium lappa* (b), és *Centaurea scabiosa* (c) érett termésének HPLC-UV kromatogramja 280 nm hullámhosszon detektálva. A folytonos vonal az intakt mintát, a szaggatott vonal a hidrolizált mintát jelöli. Jelzett csúcsok: 1: matairesinosid, 2: arctiin, 3: pinoresinol, 4: matairesinol, 5: arctigenin, 6: metilarctigenin.

Korábbi vizsgálatok bizonyították, hogy a lignán glikozidok  $2 \text{ mol dm}^{-3}$  koncentrációjú trifluoecetsavval,  $100^\circ\text{C}$  hőmérsékleten, 1 óra alatt

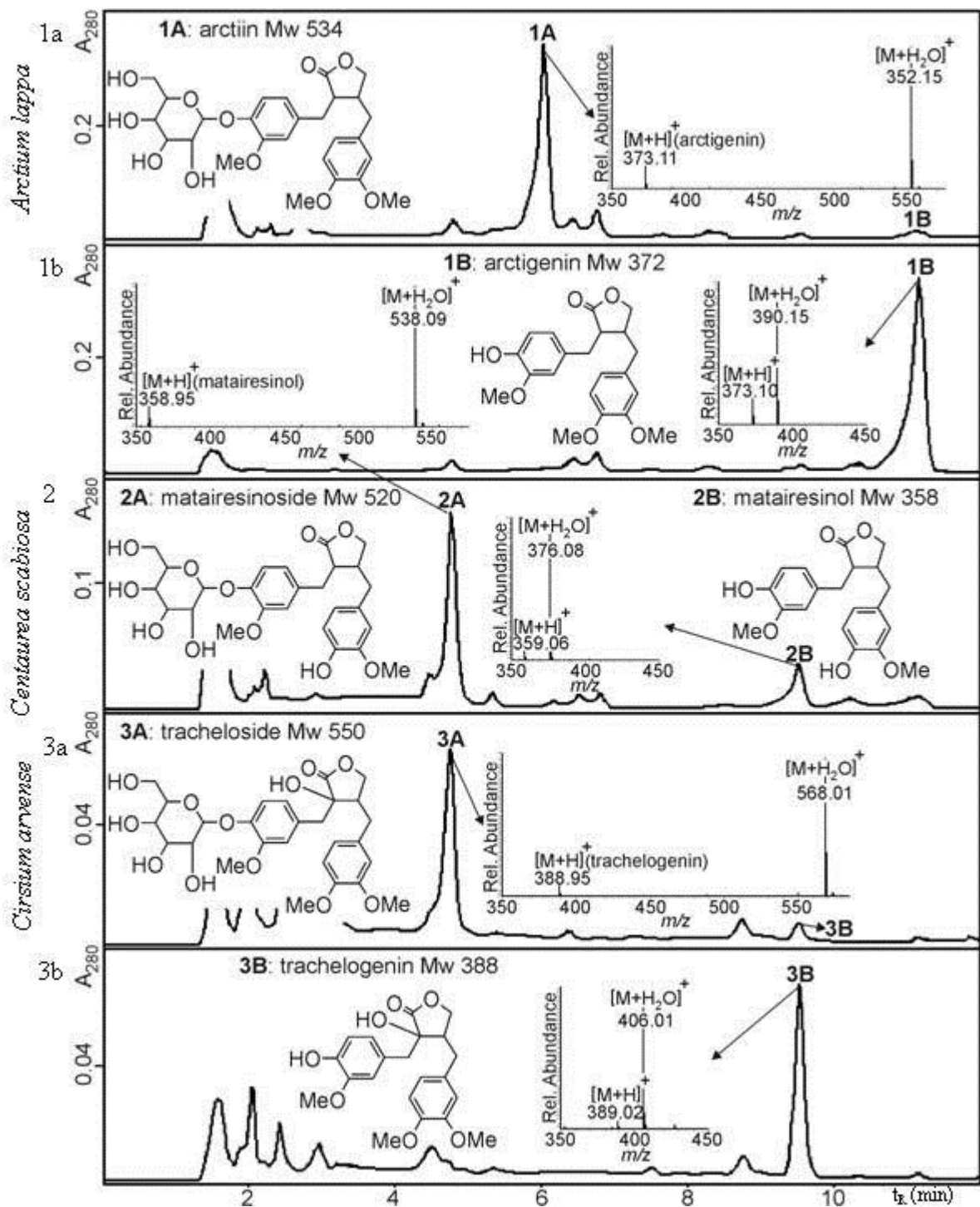
(a) teljes mértékben aglikonjukra bomlanak és

(b) a keletkezett aglikonok további bomlást nem szenvednek (Boldizsár és mtsai. 2010b).

Ezek alapján 1 mol glikozidból 1 mol aglikon keletkezik. Ez a megfigyelés a lignánok azonosításában és mennyiségi meghatározásában is fontos szerepet kap.

A hidrolizálatlan minták HPLC kromatogramjain lévő csúcsok eltűnése az azokhoz tartozó lignán glikozidos formában való jelenlétét, míg a hidrolizált kivonatoknál keletkezett/megnőtt területű csúcsok az elbomlott glikozidoknak megfelelő aglikonok jelenlétét bizonyítják.

Az 5. ábrán a három lignán glikozid/aglikon pár HPLC-ESPI-MS kromatogramján szemléltettük a fajokban található lignánok molekulaszervezetét, molekulatömegét és a tömegspektrumait. Az *A. lappa* és a *C. arvense* glikozidáz enzimmel hidrolizált terméskivonatát is feltüntettük (1b, 3b).



**5. ábra.** Az *Arctium lappa* hidrolizátlan (1a) és enzim hidrolizált (1b), a *Centaurea scabiosa* hidrolizátlan (2), és a *Cirsium arvense* hidrolizátlan (3a) és enzim hidrolizált (3b) érett termés kivonatának HPLC-MS kromatogramjai és tömegspektrumai származékkészítés nélkül.



**5. Táblázat** Az *Arctium lappa* hidrolizálatlan (Natív) és enzim hidrolizált (EnzHidr), a *Centaurea scabiosa* hidrolizálatlan (Natív), és a *Cirsium arvense* hidrolizálatlan (Natív) és enzim hidrolizált (EnzHidr) érett termés kivonatának lignán tartalma HPLC-UV készülékkel mérve

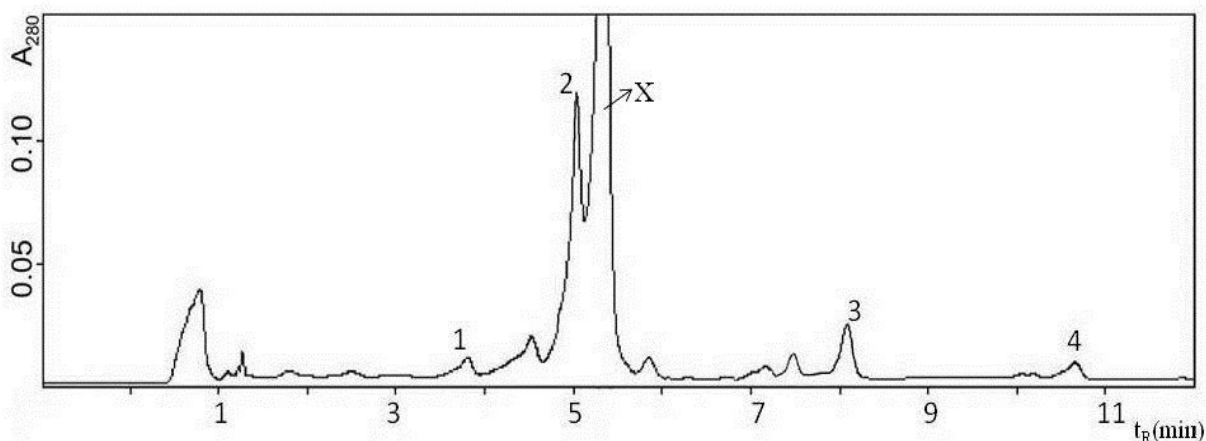
|                 | <i>Arctium lappa</i> |         | <i>Centaurea scabiosa</i> | <i>Cirsium arvense</i> |         |
|-----------------|----------------------|---------|---------------------------|------------------------|---------|
|                 | Natív                | EnzHidr | Natív                     | Natív                  | EnzHidr |
| Arctiin         | 78,0                 |         | 0,68                      | -                      | -       |
| Arctigenin      | 2,47                 | 56,4    | 0,07                      | -                      | -       |
| Matairesinoside | 1,21                 |         | 41,7                      | -                      | -       |
| Matairesinol    | 0,81                 | 1,51    | 6,5                       | -                      | -       |
| Trachelosid     | -                    | -       | -                         | 14,0                   | -       |
| Trachelogenin   | -                    | -       | -                         | 0,77                   | 9,7     |

*Jelmagyarázat:* - nem detektálható; az adatok az adott faj termésében jelen levő lignánt, valamint a lignán mennyiséget mutatják  $\text{mg g}^{-1}$  SzT-re vonatkoztatva; a minták enzimatisz hidrolízisét is elvégeztük, egy faj esetében (*C. scabiosa*) a hidrolízis nem ment végbe; az eredmények három párhuzamos mérés eredményei; az RSD% értékek 0,8% és 9,5% között változtak.

A kromatogramokon látható, hogy a lignánok elválasztásában a matairesinosid és a trachelosid (5. ábra, 2A és 3A jelzésű csúcsok), továbbá ezek aglikonkai, a matairesinol és a trachelogenin (5. ábra, 2B és 3B jelzésű csúcsok) nem válnak el egymástól. Az el nem váló komponensek mennyiségi meghatározása a MS adataik különbözősége alapján történt, vízzel képzett addukt ionjaik mérése alapján.

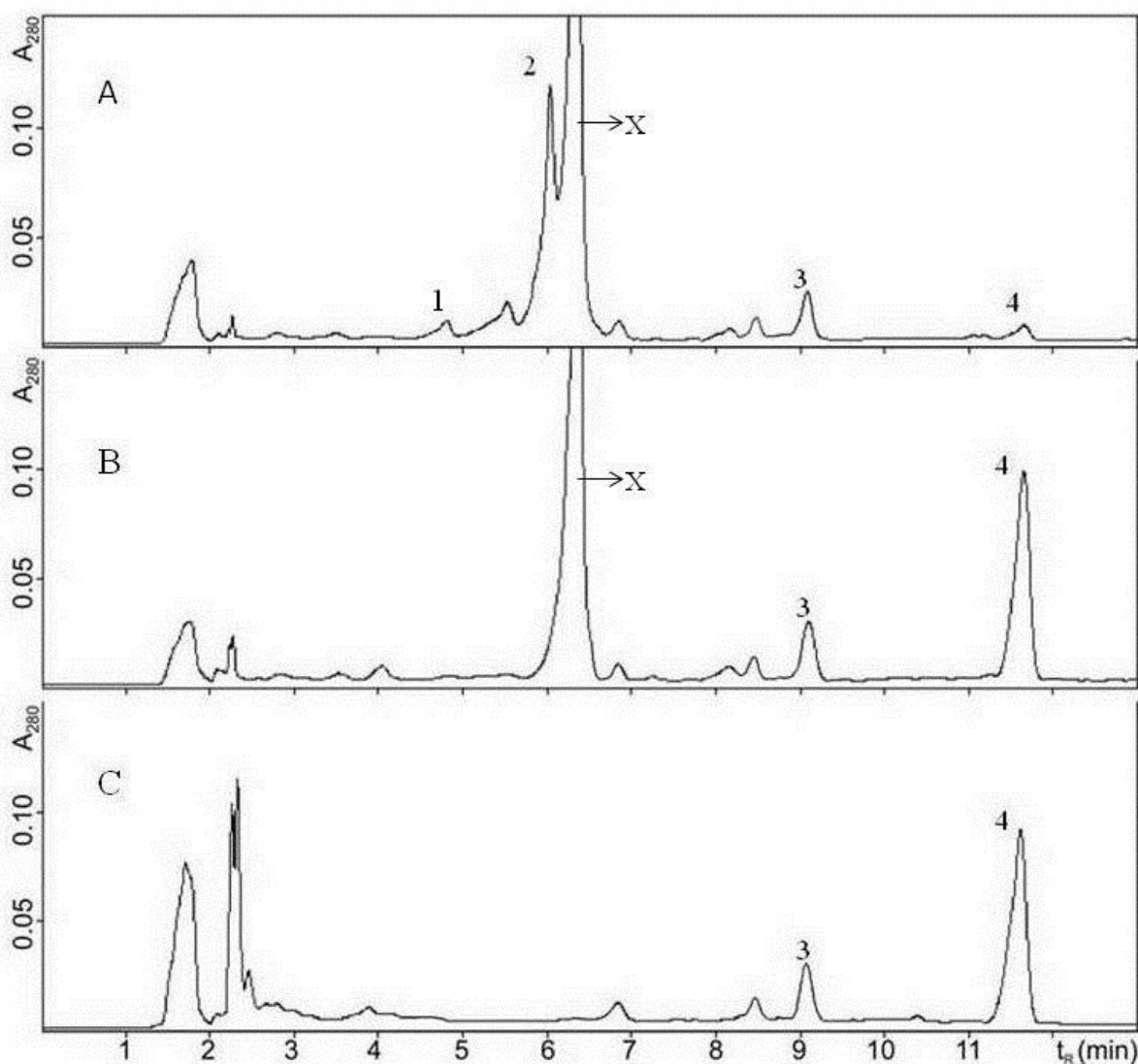
Az egymástól el nem váló lignánok egymás melletti jelenléte mellett még egy probléma mutatkozott a lignánok mennyiségi meghatározásakor, amit a *Centaurea adjarica* példáján mutatunk be.

A *Centaurea adjarica* termés kivonatának kromatogramján az általunk vizsgált lignánok közül két glikozid-aglikon párt, az arctiin-arctigenin, és a matairesinol-matairesinosid párokat találjuk (6. ábra).



**6. ábra** *Centaurea adjarica* érett termés kivonat HPLC-UV kromatogramja 280 nm hullámhosszon detektálva. Jelzett csúcsok: 1 matairesinosid; 2 arctiin; 3 matairesinol; 4 arctigenin; x ismeretlen.

A bemutatott *Centaurea adjarica* kromatogramján megfigyelhetünk az arctiintól nem teljesen elváló, azt szorosan követő, a termésben nagy mennyiségben előforduló, HPLC-MS adatai alapján valószínűleg a moschamin alkaloidot (X-szel jelzett csúcs). Ennek igazolása további vizsgálatokat igényel. Az arctiin mennyiségének meghatározása ebben az esetben a savval végzett hidrolízisen alapul. A savval hidrolizált (7. ábra, C kromatogram) és a hidrolizálatlan (7. ábra, A kromatogram) minták arctigenin tartalmának különbsége megfelel a hidrolizálatlan mintában lévő arctiin mennyiségének (ezzel a módszerrel határoztuk meg az arctiin tartalmat a *Centaurea dealbata* és *C. adjarica* fajokban, 6. táblázat).



**7. ábra** *Centaurea adjarica* hidrolizátlan (1a), glikozidáz enzimmel hidrolizált (1b), savval hidrolizált (1c) érett termés kivonat HPLC-UV kromatogramja, 280 nm hullámhosszon detektálva az abszorbanciát. Jelzett csúcsok: 1 matairesinosid; 2 arctiin; 3 matairesinol; 4 arctigenin; x feltehetően moschamin alkaloid.

## V.2. A lignánösszetétel változása a termés érése és csírázása során

### V.2.1. A lignánösszetétel változása a termésérés során

Az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és a *Cirsium arvense* fajok termés érési fázisaiban a hatóanyag összetételét és mennyiségi változását vizsgáltuk a hatóanyag kinyerés optimalizálásának érdekében HPLC-UV készülékkel. Az általunk vizsgált fajok különböző lignánokat tartalmaztak az érett termésekben nagyobb mennyiségben, az *A. lappa* arctiin-arctigenint, a *C. scabiosa* matairesinosid-matairesinolt, a *Cirsium arvense* pedig trachelosid-trachelogenint.

A termés érés folyamata során (RS-1 → RS-4) a lignánok mennyiségi változását HPLC-UV készülékkel követtük nyomon, a teljes virágzás állapotától (RS-1) a teljesen érett termésig (RS-4).

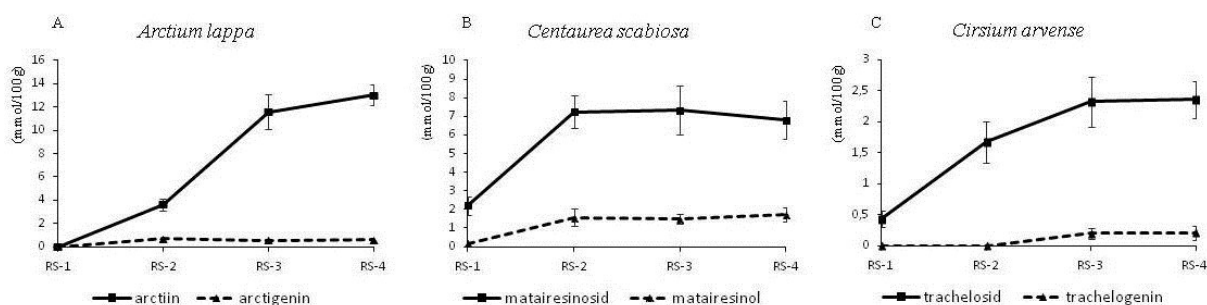
A lignán glikozidokból enzimes és savas hidrolízisek során történő aglikonképződés során kapott eredmények egyszerű összehasonlítására azok koncentrációját mmol/100 g értékben fejezzük ki.

Az *A. lappa* (8.a ábra) termése az RS-1 érettségi állapotban nem tartalmazott sem arctiint, sem arctigenint. Az RS-3 érettségi állapotban viszont már 11,6 mmol/100g arctiint tartalmazott. Az arctiin koncentrációja jelentősen már nem növekedett az RS-4 állapot eléréséig (13 mmol/100g). Az arctigenin koncentrációja a termésérés során végig alacsony maradt, a legnagyobb mennyiséget az RS-2 állapotban (0,67 mmol/100g) mértük.

A *C. scabiosa* (8.b ábra) termése az RS-1 állapotban 2,21 mmol/100g matairesinosidot, és 0,18 mmol/100g matairesinolt tartalmazott. A matairesinosid mennyisége az RS-2 állapotra több mint megháromszorozódott (7,25 mmol/100g), de a termésérés további állapotaiban a mennyisége már nem növekedett (RS-4: 6,81 mmol/100g). A matairesinol mennyisége szintén az RS-2 állapotra megnövekedett (1,56 mmol/100g), és a későbbi állapotok során mennyisége szintén nem növekedett (RS-4: 1,73 mmol/100g).

A *Cirsium arvense* (8.c ábra) termése az RS-1 termésérési állapotban 0,43 mmol/100g trachelosidot tartalmazott. A trachelosid mennyisége a termésérés során folyamatosan növekedett. Az RS-2 érési állapotban 1,67 mmol/100g, az RS-3 állapotban 2,32 mmol/100g, az RS-4 állapotban 2,36 mmol/100g trachelosid volt mérhető. A trachelogenin az RS-1 és RS-2 állapotokban nem volt detektálható, az RS-3 érési állapotban azonban már 0,19 mmol/100g-ot tartalmazott, míg az RS-4 állapotban 0,21 mmol/100g-ot.

Az RSD% értékek az irodalmilag elfogadott intervallumon belül változtak (Choi és mtsai 2003).



**8. ábra** *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa*, *Cirsium arvense* terméseiben előforduló lignánok összetétele a termésérés (RS-1 – RS-4) során, a teljes virágzástól (RS-1) az érett termésig (RS-4), HPLC-UV-vel meghatározva. A jobb szemléltethetőség miatt az egyes fajok külön diagramon szerepelnek, melyeknek koncentráció tartománya 0-16, 0-10, illetve 0-3 mmol/100g. A kapott eredmények három párhuzamos minta átlaga.

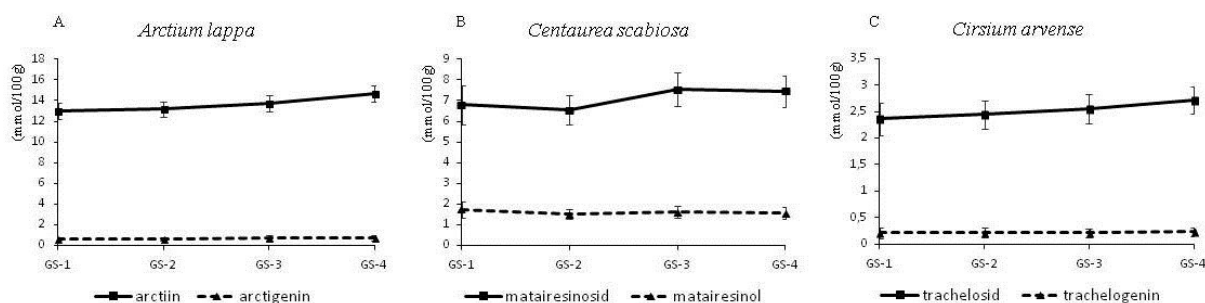
#### V.2.2. A lignánösszetétel változása a csírázás során és a lignánok megoszlása a kaszattermés termésfala és az embrió részei között: natív, csíráztatott, és glikozidáz enzimmel hidrolizált minták

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa* és a *Cirsium arvense* fajoknál 4 állapotban (GS-1 – GS-4) vizsgáltuk a csírázás során a hatóanyag összetételét és mennyiségi változását HPLC-UV készülékkel, szintén a hatóanyag kinyerés szempontjából.

Az *A. lappa* (9.a ábra) teljesen érett termésében (GS-1) mért 13 mmol/100g arctiin tartalom jelentősen nem változott a negyedik csírázási állapot (GS-4) elérésére sem, 14,7 mmol/100g volt detektálható. Az arctigenin tartalom a csírázás során nem változott (0,67 mmol/100g).

A *C. scabiosa* (9.b ábra) érett termésében (GS-1) mért 6,81 mmol/100g matairesinosid tartalom a csírázás során csak nagyon kis mértékben növekedett, a GS-4 csírázási állapot elérésekor is csak 7,46 mmol/100g volt mérhető. A matairesinol tartalom a GS-1 állapotban érte el a maximumot (1,73 mmol/100g), a csírázás során csökkent a mennyisége (GS-4: 1,56 mmol/100g).

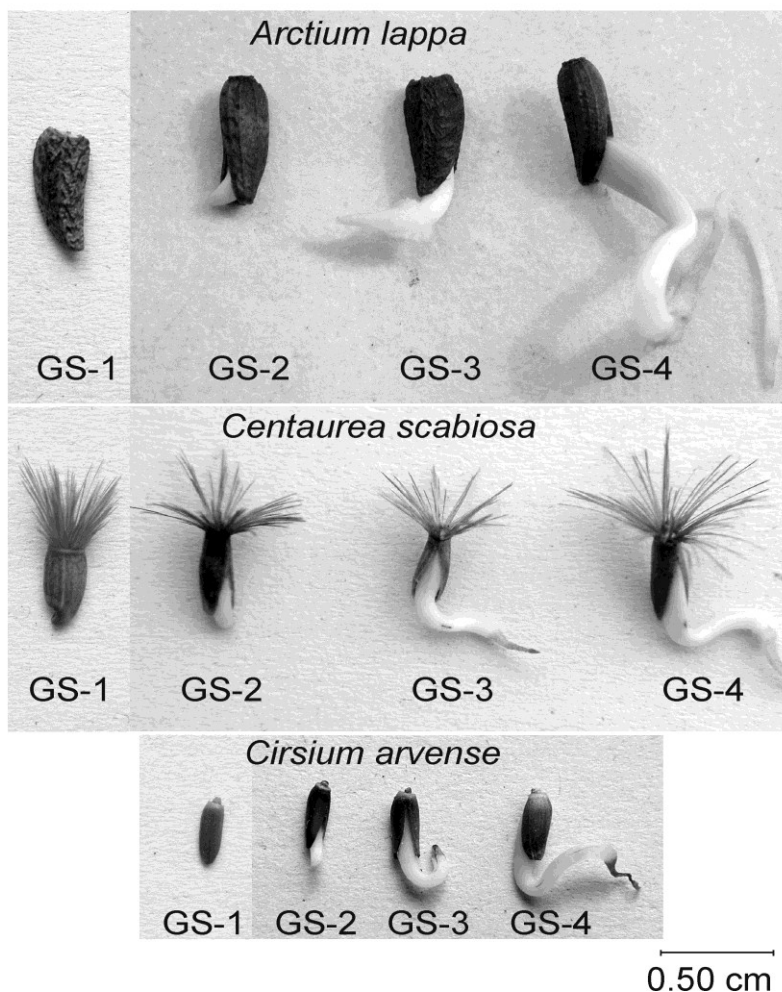
A *Cirsium arvense* (9.c ábra) érett termésében mért 2,36 mmol/100g trachelosid tartalma a GS-4 állapotra 2,71 mmol/100g-ra növekedett. A trachelogenin tartalom nem változott, GS-1 állapotban 0,21 mmol/100g volt, míg a GS-4 állapotban 0,23 mmol/100g.



**9. ábra** *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa*, *Cirsium arvense* terméseiben előforduló lignánok összetétele, és mennyisége a csírázás (GS-1 – GS-4) során, az érett terméstől (GS-1) a teljes mértékben kicsíráztatott (GS-4) termésig, melyben a termésfal teljesen elkülönül az embrió résztől, HPLC-UV-vel meghatározva. A jobb szemléltethetőség miatt az egyes fajok külön diagramon szerepelnek, melyeknek koncentráció tartománya 0-18, 0-9, illetve 0-3,5 mmol/100g. A kapott eredmények három párhuzamos minta átlaga.

Eredményeink azt mutatták, hogy a csírázás során nem változott a lignán glikozidok mennyisége, egyik faj esetében sem (9.a-c. ábra).

A tanulmányozott kaszattermések termésfala a termésfalon belüli magot borító maghéjjal összenőve kemény, fásodott állományú réteget képez (Dános 2007). Ezt a fásodott réteget (ami a termésfal és a maghép együttese) a továbbiakban termésfalnak nevezzük. A termésfalon belüli mag teljes egészében a két jól fejlett sziklevelű embrióból áll. A termés részekre választásával (ami spontán, a termés csírázása során megtörténik (10. ábra), vagy a termés szikével való kettévágása után általunk kivitelezve történik, tehát a termés jól elkülöníthető részeinek, a termésfalnak és az embriónak a lignánösszetételét tanulmányoztuk. A csírázási folyamat vizsgálatakor (10. ábra, GS-1 → GS-4) megállapítottuk, hogy a termésfal és az embrió csak az utolsó fázisban (GS-4) válnak szét teljesen.



**10. ábra** *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa*, *Cirsium arvense* terméseinek jellegzetes csírázási folyamata, négy szakaszra osztva: GS-1 ép, érett termés, GS-2 a gyököcske megjelenése, GS-3 a termés és a gyököcske azonos méretű, GS-4 a termés teljesen elkülönül az embrió és terméshártya részre. A GS-4 állapot alkalmas, hogy meghatározzuk a lignánok tartalmát a terméshártyákban külön-külön.

A 6. táblázat mutatja mind az embrió, mind a terméshártya natív és enzim hidrolizált mintáiban mért lignán értékeket. A lignán glikozidokból enzim és savas hidrolízis során történő aglikon képződéssel kapott eredmények egyszerű összehasonlítására azok koncentrációját mmol/100 g értékben fejezzük ki, száraz tömegre vonatkoztatva. A lignánok összetételét és megoszlását, minden fajban külön-külön megvizsgálva, rávilágított, hogy a lignánok a legnagyobb részben a termések embrió részében halmozódtak fel az RS-4/GS-1 állapot elérésére, az arctiin az *Arctium lappa* esetében 94,3%-ban, a matairesinosid a *Centaurea scabiosa* esetében 81,9%-ban, a trachelosid a *Cirsium arvense*-ben 91,3%-ban, a teljes szárazanyagra vetítve. A csírázási folyamat végére (GS-4) az arctiin az *A. lappa*

esetében 89,0%, a matairesinosid a *C. scabiosa* esetében 79,5%, a trachelosid a *C. arvense* esetében 86,3%, a teljes szárazanyagra vetítve.

A glikozidáz enzim hidrolízist követően, az *A. lappa* és *C. arvense* érett (RS-4/GS-1) és csíráztatott (GS-4) terméseinek embrió részében a lignán glikozidok elhidrolizáltak a megfelelő aglikonná, ellentétben a *C. scabiosa* RS-4/GS-1 termésével (6. táblázat). A *Centaurea* termésében a matairesinosid enzim hidrolízise a csírázás folyamatával kapcsolódik össze. A *Centaurea* érett termés embrió részének matairesinol tartalma az enzimatisz hidrolizátumban 0,46 mmol/100g volt szárított mintára vonatkoztatva, míg ugyanezen faj csíráztatott részében már 11,4 mmol/100g volt szárított mintára vonatkoztatva.



**6. Táblázat** *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Cirsium arvense* érett (RS-4) és csíráztatott (GS-4) terméseinek található lignánok: azonosított és mennyiségileg meghatározott a termésben, az embrió részben és a termésfal részben, natív (Intakt) és enzimés hidrolízis formában (EnzHidr).

| Lignánok                  | mmol lignán/100 g száraz termésre vonatkoztatva |              |             |                |                           |              |             |                |
|---------------------------|---|--------------|-------------|----------------|---------------------------|--------------|-------------|----------------|
|                           | Érett termések (RS-4)                           |              |             |                | Csírázott termések (GS-4) |              |             |                |
|                           | Termés  | Embrió rész  |             | Termésfal rész | Termés                    | Embrió rész  |             | Termésfal rész |
|                           | Intakt  | Intakt       | EnzHidr     | Intakt         | Intakt                    | Intakt       | EnzHidr     | Intakt         |
| <i>Arctium lappa</i>      |   |              |             |                |                           |              |             |                |
| Arctiin                   | 13,0  | 23,2 (94,3%) |             | 0,21           | 14,7                      | 25,9 (89,0%) |             | 0,26           |
| Arctigenin                | 0,59  | 0,64         | <b>22,9</b> | 0,59           | 0,68                      | 0,81         | <b>27,5</b> | 0,57           |
| <i>Centaurea scabiosa</i> |   |              |             |                |                           |              |             |                |
| Matairesinosid            | 6,81  | 11,2 (81,9%) |             | 0,22           | 7,46                      | 11,8 (79,5%) |             | 0,19           |
| Matairesinol              | 1,73  | 0,41         | 0,46        | 3,94           | 1,56                      | 0,45         | <b>11,4</b> | 3,35           |
| <i>Cirsium arvense</i>    |   |              |             |                |                           |              |             |                |
| Trachelosid               | 2,36  | 4,96 (91,3%) |             | 0,13           | 2,71                      | 5,51 (86,3%) |             | 0,14           |
| Trachelogenin             | 0,21  | -            | <b>4,85</b> | 0,38           | 0,23                      | -            | <b>6,00</b> | 0,39           |

Jelmagyarázat: - nem kvantifikálható. A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása HPLC-MS készülékkel történt. A félkövérrel kiemelt adatok az enzimátikus hidrolízis hatására megnövekedett lignán mennyiséget mutatják. A glikozidok könnyebb összehasonlíthatósága végett %-os értékeket is megadtunk. A táblázat szürke háttérű része a csíráztatott termésekből nyert adatokat mutatja. Az eredmények három párhuzamos mérés eredményei; az RSD% értékek 3,9% és 9,2% között változtak.

### V.3. A *Centaurea* fajok terméseinek lignánösszetétel vizsgálata

#### V.3.1. A natív minták lignánösszetétele

A korábbi irodalmi eredmények szerint, melyeknél a *Centaurea* fajok lignánösszetételét vizsgálták, leginkább a fajokban található lignánok izolálásukat követő azonosításukra törekedtek (Irodalmi bevezető 3. táblázat). A felsorolt közlemények nagyobb részében a szerzők az általuk tanulmányozott fajokban mérhető lignánok koncentrációit nem közölték, csak az izolálás során kapott lignán mennyiséget adták meg. Az általunk, ezekből az adatokból számítható koncentrációkat adtuk meg a 3. táblázatban. Így a táblázat adatai nem jelentenek biztos alapot a fajok lignán tartalmának összehasonlítására. Az egymást követő izolálási lépések során nagymértékű lignánveszteség történhet. Ennek megfelelően a számított adatok összehasonlítása nehézségekbe ütközik. Így megállapíthatjuk, hogy az irodalmi adatok a *Centaurea* fajok lignán összetételének és tartalmának egyértelmű összehasonlítására nem használhatóak fel.

Ugyanakkor az egyértelműnek tűnik, hogy a lignánok legnagyobb mennyiségben glikozid formájukban (arctiin és matairesinosid) vannak jelen. Összehasonlítva a glikozidok mennyiségét a termésekben és a földfeletti hajtásokban, megállapítható, hogy a termések jelenthetik az optimális forrását ezen lignán glikozidoknak a kinyeréséhez.

Tekintettel az irodalmi eredmények fentiekben leírt hiányosságaira, a rendelkezésünkre álló 11 *Centaurea* faj érett termésének lignántartalmát határoztuk meg és hasonlítottuk össze. Az eredmények alapján azon fajok *in vitro* kultúrájának létrehozását terveztük, melyek tartalmazzák a tanulmányozott lignánokat.

A lignánok mennyiségének összesítésével kapott eredményekben (7. táblázat, összlignán tartalom) nagy eltérések mutatkoztak az egyes fajok között. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált *Centaurea* fajok közül a *C. dealbata* összesített lignántartalma volt a legmagasabb ( $73,24 \text{ mg g}^{-1}$ ), ami a legalacsonyabbhoz viszonyítva (*C. cyanus*) két nagyságrendbeli eltérést jelentett.

*C. dealbata* termése matairesinosid-ot  $1,97 \text{ mg g}^{-1}$ , arctiint  $58,7 \text{ mg g}^{-1}$ , matairesinolt  $10 \text{ mg g}^{-1}$ , és arctigenint  $2,57 \text{ mg g}^{-1}$  mennyiségben tartalmazott.

Eredményeink alapján a fajokat 4 csoportba tudtuk osztani a glikozid-aglikon párok előfordulása/mennyisége szerint. Az első típusba azok a fajok tartoztak, amelyekben az arctiin/arctigenin (hidrolizálatlan/hidrolizált mintában) fordultak elő nagyobb mennyiségben

(*C. adjarica* → *C. pannonica* fajok ebben a sorrendben a 7. táblázatban). Az összlignán tartalmukhoz képest, több, mint 90%-ban arctiin tartalmazott a *C. americana* (53,6 mg g<sup>-1</sup> arctiin az 59,2 mg g<sup>-1</sup> összlignán tartalomhoz képest), és a *C. calcitrapa* (59,6 mg g<sup>-1</sup> arctiin az 63,5 mg g<sup>-1</sup> összlignán tartalomhoz képest). Az ebbe a csoportba tartozó többi faj termésének összlignán tartalmának is több, mint a fele arctiin volt. A száraz tömegre vonatkoztatott arctiin tartalomban is jelentősek voltak az eltérések a fajok között is. Az arctigenin mennyisége egy nagyságrenddel elmaradt a termésekben az arctiinhoz viszonyítva.

A második csoportot a matairesinosid-matairesinol lignán párt legnagyobb mennyiségben (hidrolizálatlan/hidrolizált mintában) felhalmozó *C. scabiosa* jelenti. Matairesinosidot tartalmazott a *C. scabiosa* termése a legnagyobb mennyiségben az összlignántartalmához viszonyítva (41,7 mg g<sup>-1</sup> matairesinosidot az 50,1 mg g<sup>-1</sup> összlignán tartalomhoz képest). A *C. scabiosa* termése 6,5 mg g<sup>-1</sup> matairesinolt tartalmazott.

Ezekkel szemben a *C. solstitialis* hasonló mennyiségben tartalmazta az arctiin és matairesinosid lignánokat és ezek aglikonjait is, a hidrolizálatlan kivonatában, így ezt egy 3. típusnak tekinthetjük.

A táblázatban szereplő három utolsó faj (*C. cyanus*, *C. montana* és *C. triumfetti*) pedig nagyon alacsony lignántartalmával tűnik ki (4. típus). A kapott eredmények felvetik annak a gondolatát, hogy kapcsolat lehet a *Centaurea* fajok hagyományos rendszertani besorolása és lignánösszetétele között, azaz, a lignánok kemotaxonómiai szerepének tanulmányozását. Tekintettel azonban a vizsgált fajok kis számára, további fajok vizsgálatba vonása későbbi terveinkben szerepel.

A párhuzamos mérések reprodukálhatóságát RSD%-ban fejeztük ki. Az értékek 2,1 és 11,3 között változtak, az irodalmilag elfogadott intervallumon belül.

**7. táblázat** *Centaurea* termékek lignán összetétele natív és hidrolizált mintákban HPLC-UV készülékkel mérve.

| Lignánok                            | <i>C. adjarica</i> |      | <i>C. americana</i> |      | <i>C. calcitrapa</i> |      | <i>C. dealbata</i> |      | <i>C. jacea</i> |      | <i>C. pannonica</i> |      | <i>C. solstitialis</i> |      | <i>C. scabiosa</i> |      | <i>C. cyanus</i> |      | <i>C. montana</i> |      | <i>C. triumphetti</i> |      |
|-------------------------------------|--------------------|------|---------------------|------|----------------------|------|--------------------|------|-----------------|------|---------------------|------|------------------------|------|--------------------|------|------------------|------|-------------------|------|-----------------------|------|
|                                     | natív              | hidr | natív               | hidr | natív                | hidr | natív              | hidr | natív           | hidr | natív               | hidr | natív                  | hidr | natív              | hidr | natív            | hidr | natív             | hidr | natív                 | hidr |
| matairesinosid                      | -                  | -    | 3,12                | -    | 3,47                 | -    | 1,97               | -    | -               | -    | -                   | -    | 1,58                   | -    | <b>41,7</b>        | -    | -                | -    | -                 | -    | -                     | -    |
| trachelosid                         | -                  | -    | -                   | -    | -                    | -    | -                  | -    | -               | -    | 2,2                 | -    | -                      | -    | 1,1                | -    | -                | -    | -                 | -    | -                     | -    |
| arctiin                             | <b>12</b>          | -    | <b>53,6</b>         | -    | <b>59,6</b>          | -    | <b>58,7</b>        | -    | <b>43</b>       | -    | <b>41,4</b>         | -    | 1,04                   | -    | 0,68               | -    | <b>0,42</b>      | -    | <b>1,87</b>       | -    | 0,63                  | -    |
| matairesinol                        | 1,4                | 1,8  | 2,18                | 4,1  | -                    | 2,25 | 10                 | 11,4 | 8,8             | 9,2  | 14,3                | 15,3 | <b>1,73</b>            | 2,93 | 6,5                | 38,1 | -                | -    | 0,14              | 0,18 | 0,25                  | 0,29 |
| trachelogenin                       | -                  | -    | -                   | -    | -                    | -    | -                  | -    | -               | -    | -                   | 1,63 | -                      | -    | -                  | 0,8  | -                | -    | -                 | -    | -                     | -    |
| arctigenin                          | 1,41               | 10   | 0,37                | 42,6 | 0,45                 | 40,9 | 2,57               | 47,4 | 1,49            | 33,5 | 1,53                | 30,7 | 1,71                   | 2,03 | 0,07               | 0,44 | -                | 0,31 | 0,15              | 1,5  | -                     | 0,46 |
| összlignán<br>tartalom              | <b>14,8</b>        | 11,8 | <b>59,2</b>         | 46,7 | <b>63,5</b>          | 43,1 | <b>73,2</b>        | 58,8 | <b>53,2</b>     | 42,7 | <b>59,4</b>         | 47,6 | <b>6,06</b>            | 4,96 | <b>50,1</b>        | 39,3 | <b>0,42</b>      | 0,31 | <b>2,16</b>       | 1,68 | <b>0,88</b>           | 0,75 |
| összlignán<br>tartalom<br>mmol/100g | <b>3,22</b>        | 3,4  | <b>11,4</b>         | 12,6 | <b>12,0</b>          | 11,6 | <b>14,2</b>        | 15,9 | <b>11,3</b>     | 12,0 | <b>13,9</b>         | 14,3 | <b>1,4</b>             | 1,3  | <b>10,2</b>        | 11,0 | <b>0,08</b>      | 0,08 | <b>0,57</b>       | 0,61 | <b>0,19</b>           | 0,21 |
| RSD%                                | 4,8                |      | 7,2                 |      | 5,3                  |      | 9                  |      | 2,1             |      | 8,2                 |      | 11                     |      | 3,7                |      | 10               |      | 11,3              |      | 6,4                   |      |

*Jelmagyarázat: - nem detektálható. A félkövérrel kiemelt adatok az adott faj termésében legnagyobb mennyiségben jelen levő lignánt, valamint a lignán mennyiséget mutatják mg g<sup>-1</sup> illetve az összlignán mennyiséget mmol/100 g SzT-re is vonatkoztatva. A minták β-glikozidáz enzimátikus hidrolízisét is elvégeztük, egy faj kivételével (C. scabiosa), ahol a TFE hidrolízis útján kapott eredményeket tüntettük fel. Az eredmények három párhuzamos mérés eredményei; az RSD% értékek 2,1% és 11,3% között változtak.*

### V.3.2. A hidrolizált minták lignánösszetétele

Eredményeinkből egyértelműen megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált *Centaurea* termésekben a lignán glikozidok halmozódtak fel nagyobb mennyiségben. Az utóbbi évek kutatásai egyértelműen megállapítják, hogy az élettani vizsgálatokban a lignánok aglikonos formái bizonyultak hatásosabbnak. Mivel a termések nagy mennyiségben tartalmaztak lignánokat, de glikozidos formában, glikozidáz enzimés vagy savas hidrolízis útján aglikont nyerhetünk belőlük (5. és 6. ábra). A korábban bemutatott ismeretlen eredetű anyag (6. és 7. ábra), feltehetően a moschamin alkaloid, az enzimatis hidrolízis hatására nem, de a savas hidrolízis hatására ismeretlen termékekre bomlott, melyek a kromatogramokon nem jelentek meg.

A 5. táblázatban feltüntetett eredmények a glikozidáz enzimés (továbbiakban enzimés) és savas hidrolízis eredményének átlagai egy faj kivételével. A *C. scabiosa* terméseiben nem történt meg enzimés hidrolíziskor a matairesinosid bomlása matairesinollá, így itt csak a savas hidrolízis eredménye szerepel a hidrolizált adatokat feltüntető oszlopban.

Eredményeink alapján savas illetve enzimés hidrolízis útján lignán aglikont tudtunk előállítani. Arctigenint a legnagyobb mennyiségben a *C. dealbata* terméséből lehetett kinyerni, 47,4 mg g<sup>-1</sup>-ot, matairesinolt, 38,1 mg g<sup>-1</sup>-ot a *C. scabiosa* terméséből, trachelogenint pedig 1,63 mg g<sup>-1</sup> mennyiségben a *C. pannonica* terméséből.

Mivel mindegyik vizsgált *Centaurea* faj tartalmazott lignánokat, és a fajok között jellemző különbségek voltak ezek összetételében, a későbbi szövettényészetekkel történő lignántermeltetési vizsgálatokhoz mindegyik, rendelkezésre álló fajból célszerűnek tartottuk tenyészetek létrehozását.

### V.4. A *Centaurea* fajok szövettényészeinek létrehozása, lignánösszetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint morfológiája

Az intakt növények mellett az *in vitro* növényi sejttényészetek is egyre gyakrabban kiindulópontjai lehetnek a hatóanyagok hatékony kinyerésének, számos előnyüknek köszönhetően. Az intakt növények hatóanyag tartalmához képest az *in vitro* kultúráké általában legalább egy nagyságrenddel alacsonyabb, de ez akár a többszörösére is fokozható különböző biotechnológiai módszerek segítségével.

Bízatóak voltak az eredmények a *Centaurea* termések lignánösszetételének vizsgálata, és mennyiségi meghatározása után. Ismert azonban, hogy ezen növények többségében a biológiailag aktív hatóanyag a termésben halmozódik fel.

#### **V.4.1. A *Centaurea* fajok szövettenyészetének létrehozása**

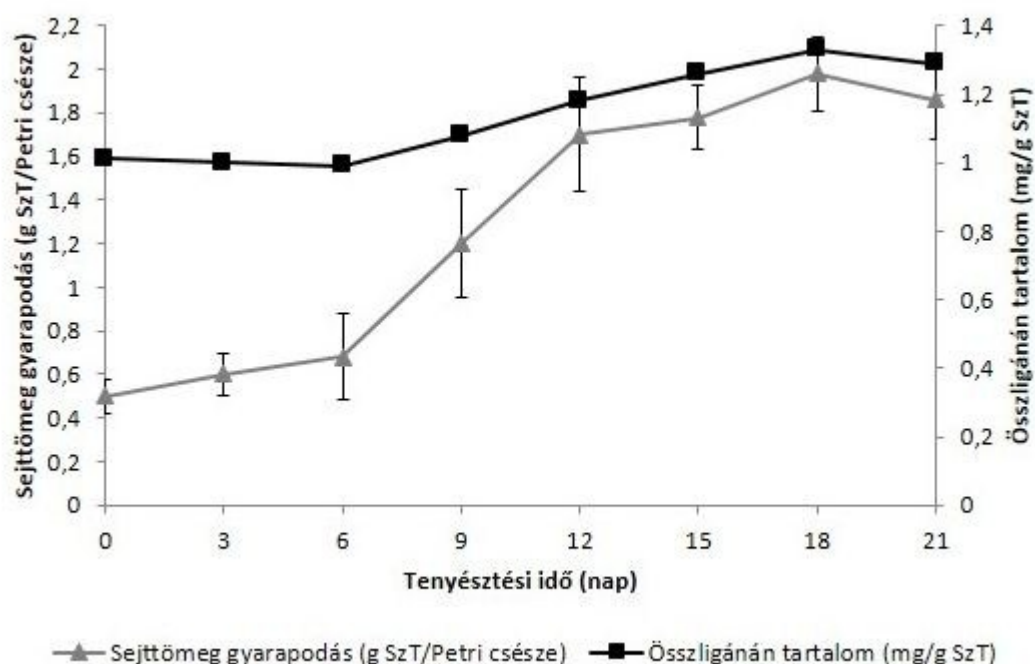
Az igen sok fajt tartalmazó *Centaurea* nemzetség közül kevés olyan fajt ismerünk, melynek *in vitro* sejttenyészetét leírták az irodalomban, azonban olyat, amelyet a lignán termelő képessége miatt (Kakegawa és mtsai. 1987; Vidal és mtsai. 2004), egyet sem. A vizsgált termések eltérő lignántartalma alapján azt feltételezhetjük, hogy az ezekből elindított *in vitro* kultúrák hatóanyag tartalomban szintén különbözhetnek egymástól, de arányaiban a termésben találtakkal megegyeznek. Ezért mind a 11, általunk vizsgált *Centaurea* fajból indítottunk el sejttenyészeteket, hogy megtaláljuk a leghatékonyabb lignántermelő *Centaurea in vitro* kultúrát.

Tizenegy *Centaurea* fajnál B5 kalluszosító táptalajon indítottunk el a kallusz kultúrákat, amely munka során 8 fajból sikerült szekunder kalluszt létrehozni. Ezek a fajok a *C. adjarica*, *C. americana*, *C. calcitrapa*, *C. cyanus*, *C. jacea*, *C. montana*, *C. scabiosa*, és a *C. solstitialis* voltak. 3 faj esetében nem sikerült kallusz tenyészetet létrehozni, ezek a *C. dealbata*, *C. pannonica*, és a *C. triumphetti* voltak.

A lignántermelés szempontjából a szekunder kalluszokból megkíséreltünk szuszpenziós tenyészeteket létrehozni, de ez irányú törekvéseink ez idáig nem jártak sikerrel.

#### **V.4.2. A *Centaurea adjarica* biomassa termelése**

A legmagasabb lignántermelés elérésére érdekében a *C. adjarica* MSA30 tápközegen, természetes megvilágítási módot alkalmazva, vizsgáltuk a differenciációt nem mutató kallusz kultúrájának sejttömeg-gyarapodását és az összlignántartalom változását a három hetes tenyésztési idő alatt. A 3 hetes tenyésztési idő alatt a 3 mintát 3 naponta gyűjtöttünk be a tenyészet biomassa termelésének nyomonkövetéséhez. (11. ábra).



**11. ábra** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fénnel világított kallusz kultúrájának össztömeg-gyarapodása és a tenyészet összlignántartalma. A 3 hetes tenyésztési idő alatt a 3 mintát 3 naponta gyűjtöttünk be. Az adatok három, független mérés átlagai, amelyeket száraz tömegre (SzT) vonatkoztattuk. A sejttömeg gyarapodás adatai esetén a standard hibaértékeket tüntettük fel a görbén, az összlignán görbénél az RSD értékek 3,8 és 14,4 % között mozogtak.

A *Centaurea adjarica in vitro* differenciációt nem mutató kallusz kultúrájának növekedési görbéjén látható, hogy a kultúra sejttömege már az első naptól kezdve folyamatosan növekszik a 18. napig. A maximumot a 18. napon éri el majd ezt követően lassú csökkenés tapasztalható. A maximum érték a kiindulási mennyiség több mint háromszorosa.

Az összlignán tartalom az első 6 nap folyamán csökkent, majd nagyon lassú növekedést mutatott a 6. és 18. nap között. A maximumot a 18. napon érte el, a kezdeti összlignán tartalomhoz képest 30%-kal megemelkedett. Az optimalizált tápközeg és megvilágítási mód esetén a maximális lignántartalom kinyerése érdekében a kallusz kultúrákat a 18. nap környékén kell begyűjteni.

#### V.4.3. Az *in vitro* kallusz kultúrák differenciációja

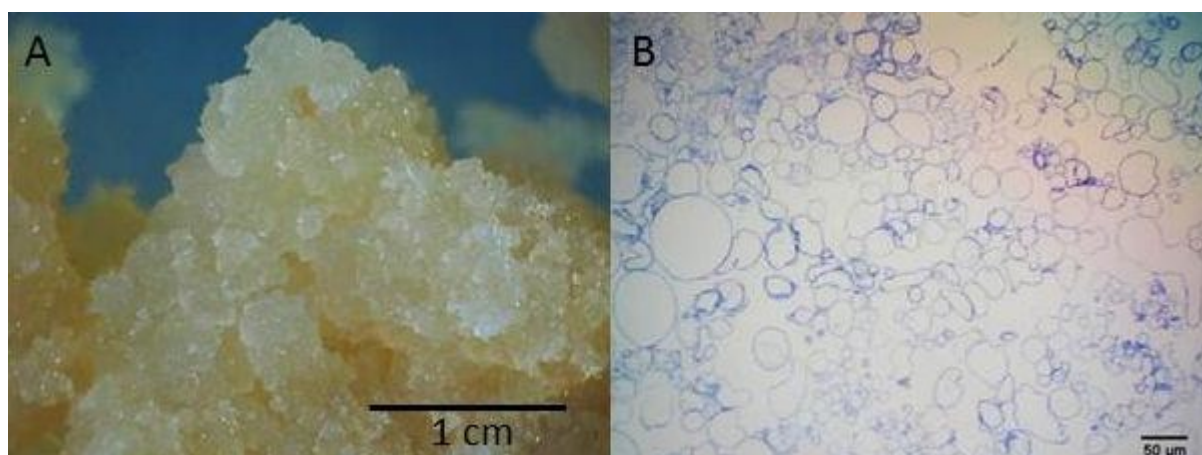
A különböző *Centaurea* fajokból indított szekunder kalluszokat MSA30 táptalajra helyeztük fenntartás céljából. Előkísérletek alapján ez a táptalaj alkalmasnak bizonyult

*Centaurea* fajok nevelésére. A tenyészetek növekedése során azt tapasztaltuk, hogy az egyes genotípusok eltérő módon reagáltak a táptalajban található összetevők kombinációjára.

A szekunder kalluszok morfológiájukat tekintve igen heterogének voltak, sőt az egy fajból létrehozott tenyészetek is. Egy Petri-csészén belül is előfordultak különböző morfológiájú, differenciált és differenciálatlan sejtek is.

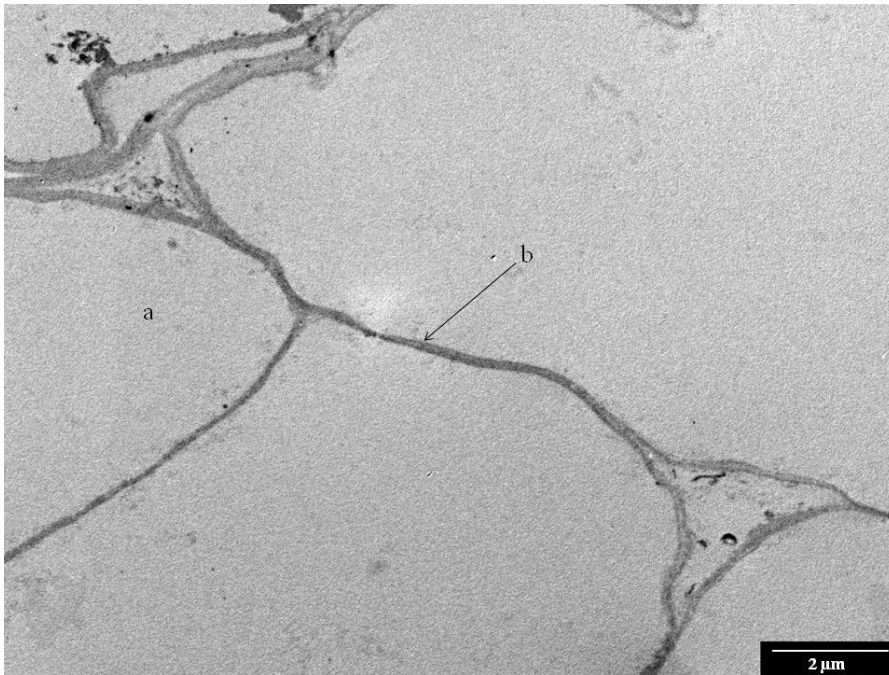
Egyes fajok hajtáskezdeményt (*C. jacea*), hajtás- és gyökérkezdeményt (*C. adjarica*), más fajok csak gyökérkezdeményt (*C. americana* és *C. scabiosa*) képeztek, míg pl. a *C. solstitialis* nem mutatott organizációs hajlamot és tipikus kallusz állapotban maradt, a többi, fel nem sorolt faj kallusz tenyészetéhez hasonlóan.

*C. solstitialis* jellegzetes kallusz-tulajdonságokat mutató, dezorganizált, jól osztódó kallusza, drapp színű, morzsálékos (12.a ábra). A fénymikroszkópos vizsgálat szerint (12.b ábra) a kallusz laza szerkezetű, a sokféle méretű és alakú sejt között hatalmas intercelluláris terek helyezkednek el. A sejtek alakja általában kerekded, de ovális, hosszúkás, amorf sejtek egyaránt előfordulnak. Az ultrastruktúrális vizsgálatok (13. ábra) azt mutatták, hogy a faj kallusza jellegzetes parenchimatikus sejtekből áll, a sejtek nagy vakuólummal és vékony citoplazma réteggel rendelkeznek, kevés, fejletlen sejtalkotóval, amelyekben kloroplasztiszokat nem találtunk. Ez a megállapítás összhangban volt azzal, hogy a sejt kultúra barnás színű volt (12.a ábra).



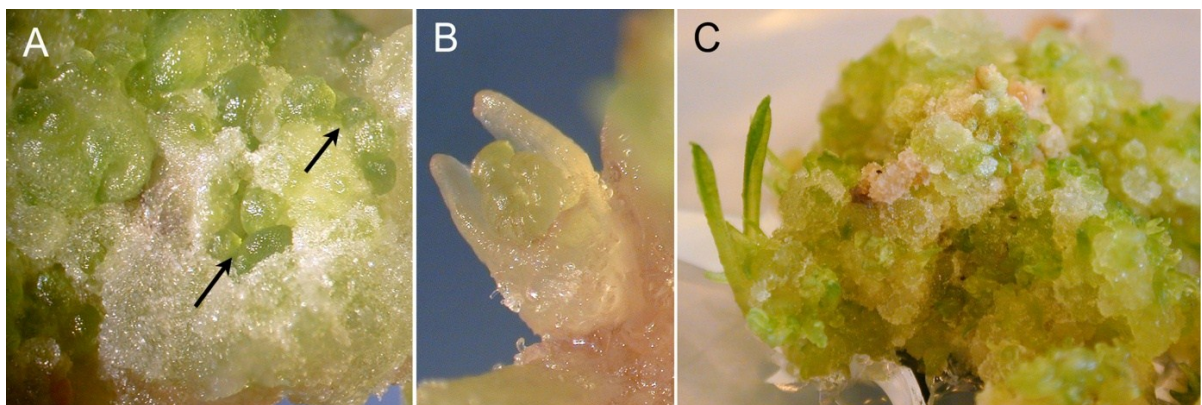
**12. ábra:** *C. solstitialis* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott, differenciációt nem mutató kallusztenyészetének sztereomikroszkópos (A) és fénymikroszkópos (B) képe.





**13. ábra:** *C. solstitialis* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott, differenciációt nem mutató kallusz sejtjeinek ultrastruktúrája; a: vakuolum, b: sejtfal és a hozzá simuló vékony citoplazma, c: intercelluláris

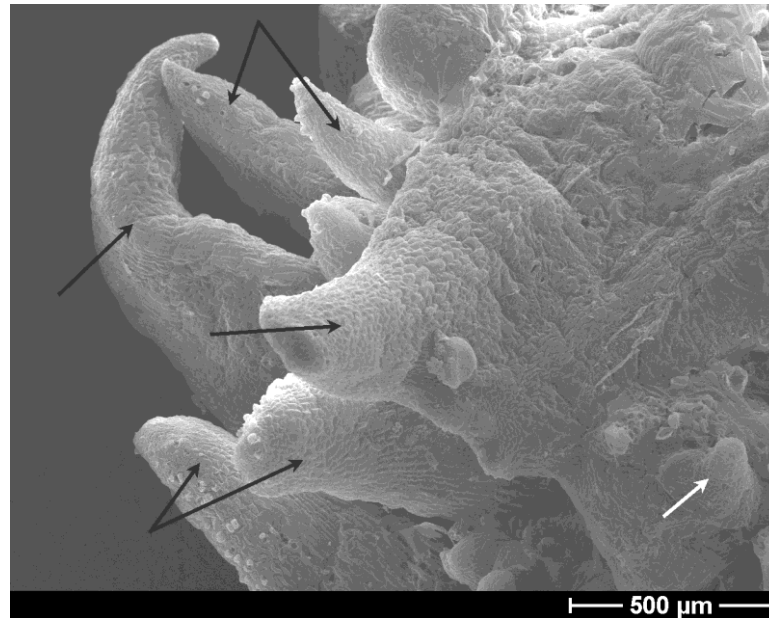
A *C. adjarica* és *C. jacea* fajoknak nagyon hasonló zöld színű, differenciálódó kallusz tenyészetek fejlődtek, a tenyészetek sejtjei között kis hajtáskezdemények jelentek meg nagy tömegben (14. ábra). A kezdetben apró, zöld hajtásprimordiumokon (14.a ábra) kialakulnak a levélkezdemények (14.b ábra), melyekből néhány hét alatt levelek fejlődnek (14.c ábra).



**14. ábra:** *C. adjarica* hajtásorganizációjának különböző fázisai, sztereomikroszkóppal, MSA 30 táptalajon, természetes fényen; A: tömeges hajtáskezdemények jelennek meg, B: levélkezdemény, C: levél differenciálódott

A scanning elektronmikroszkópos felvételek (15. és 16. ábrák) is egyértelműen igazolták a kallusz tenyészet nagymértékű organogenetikus képességét. Egyrészt, nagy

sűrűségben jelennek meg a levélprimordiumok, és közvetlenül mellettük a hajtásprimordiumok is (15. ábra). A kutikulával fedett epidermiszen fejlett sztómák találhatók (16. ábra).

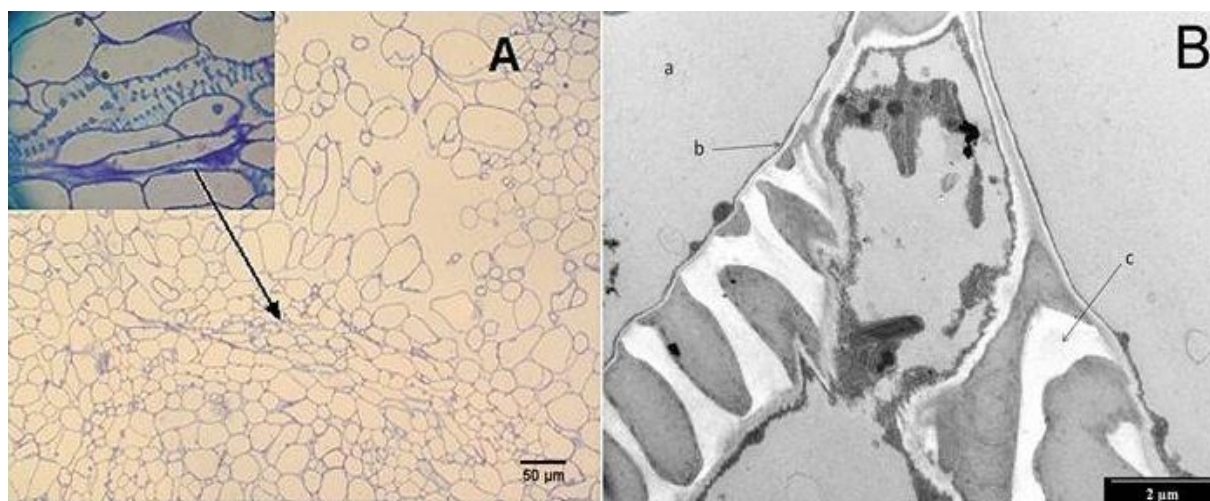


**15. ábra:** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott, organizálódó kalluszának pásztázó elektronmikroszkópos felvétele (fekete nyíl = levélprimordium, fehér nyíl = hajtásprimordium).



**16. ábra:** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott, kallusz levélprimordiumának pásztázó elektronmikroszkópos képe. Nyitott sztómák zárósejtjei (fekete nyíl) és kutikulával fedett sztómák zárósejtjei (fehér nyíl) az epidermiszen.

Az organogenezis kezdeti fázisait vizsgáltuk fény- és transzmissziós elektronmikroszkóppal. A rendezetlenül elhelyezkedő kalluszsejtek között egy-egy csoportban több tucatnyi sejt egy irányba rendeződött, szorosan egymás mellett, ez az organizációs góc (17.a ábra). Az egy irányba rendeződött sejtek mutatják a későbbi hajtás tengelyét. A sejtek alakja a kallusz többi sejtjéhez képest hosszúkás, keskeny, kihegyezett végű, megnyúlt. A sejtek szorosan egymás mellett helyezkednek el. A középső sejtek falán jól látható a spirális sejtfalvastagodás (17.b ábra). A kalluszból történő regenerálódás során először tracheida sejtek alakulnak ki, melyek a kallusz differenciációjának első lépéseként tekinthetők.

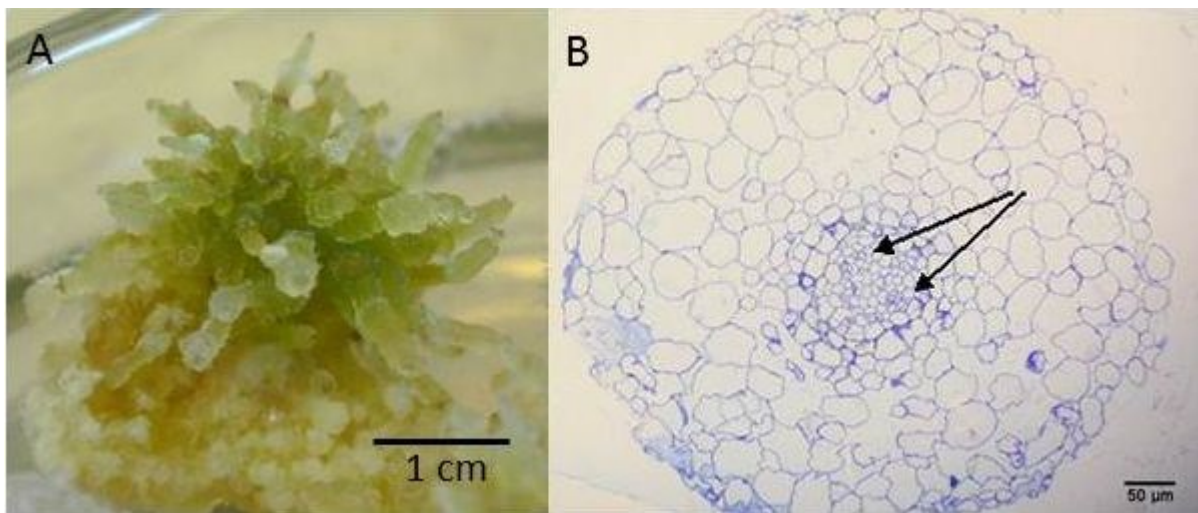


**17. ábra:** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott kallusza, a hajtásorganizáció kezdeti stádiuma fény- (A) és elektronmikroszkópos képen; Beszúrt ábra: az (A) ábra nyíllal jelölt részének 10x nagyítása; a (B) ábra az elsődleges kéreg egy differenciálódott sejtjét mutatja be; a: vakuolum, b: sejtfal és a hozzá simuló vékony citoplazma organelumokkal, c: másodlagos sejtfalvastagodás

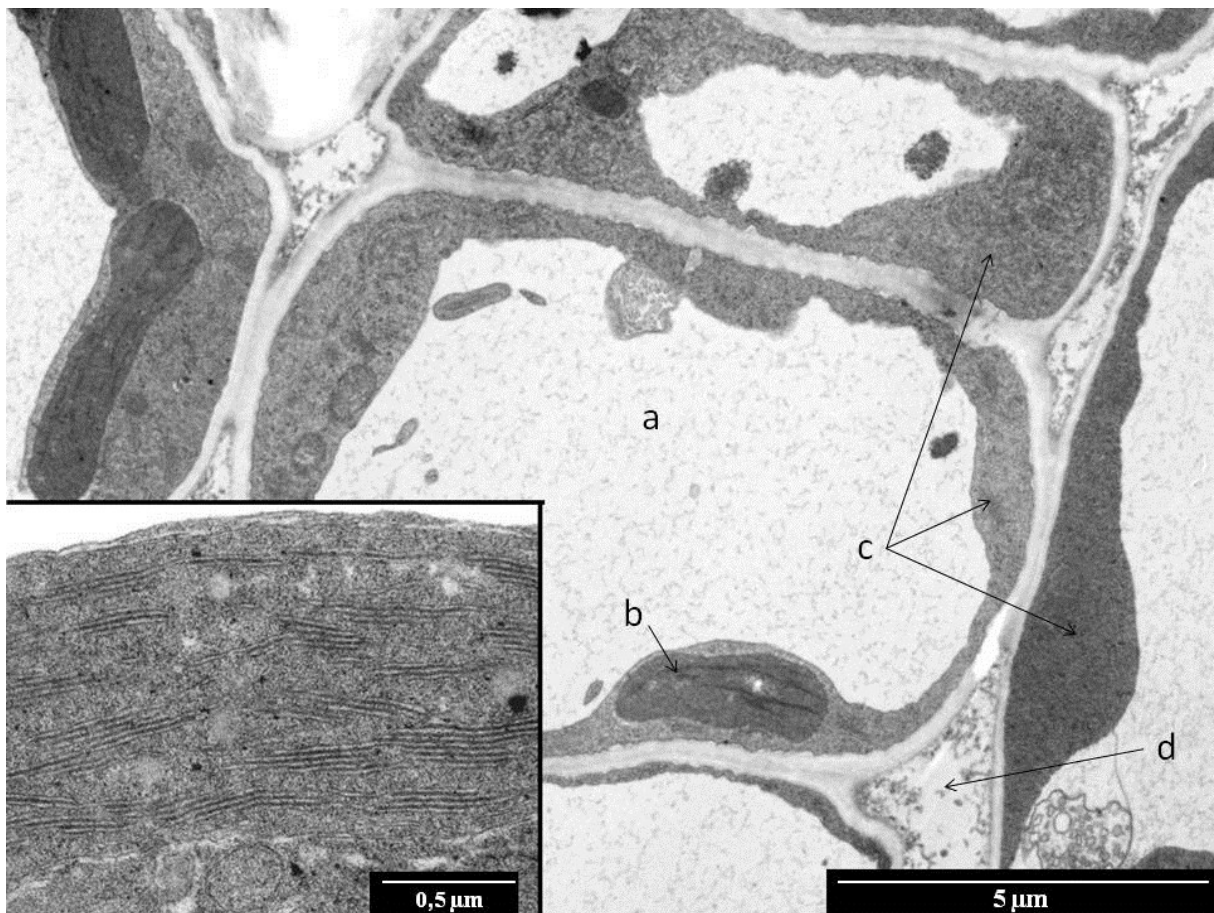
A *C. scabiosa* és *C. americana* kalluszaira a gyökérorganizáció, valamint a *C. adjarica* egyes kallusz tenyészeire is ez jellemző. Érdekes tény, hogy a *C. adjarica* egyféle táptalajon, az MSA30-on két különböző irányú differenciációt mutatott. A fajok között eltérő volt a gyökérorganizációs képesség, ezért több típust is megkülönböztettünk.

A *C. adjarica* faj egyes kalluszsejtjeiből zöldes színű gyökér szerű struktúrák fejlődtek ki (18.a ábra), a kalluszcsozó felületét teljesen beborítják a belőle sugárirányban kifelé növekvő gyökér kezdemények. A keresztmetszeti kép (18.b ábra) egy gyökérszerű struktúrát igazol, amely átmenetet mutat a kalluszból a gyökérorganizáció felé. A kortex laza, nagyméretű parenchimasejtekből áll, ettől jól elkülöníthető a kisméretű központi henger. A xilémelemek differenciációjának kezdete is felfedezhető (18.b ábra, nyilak).





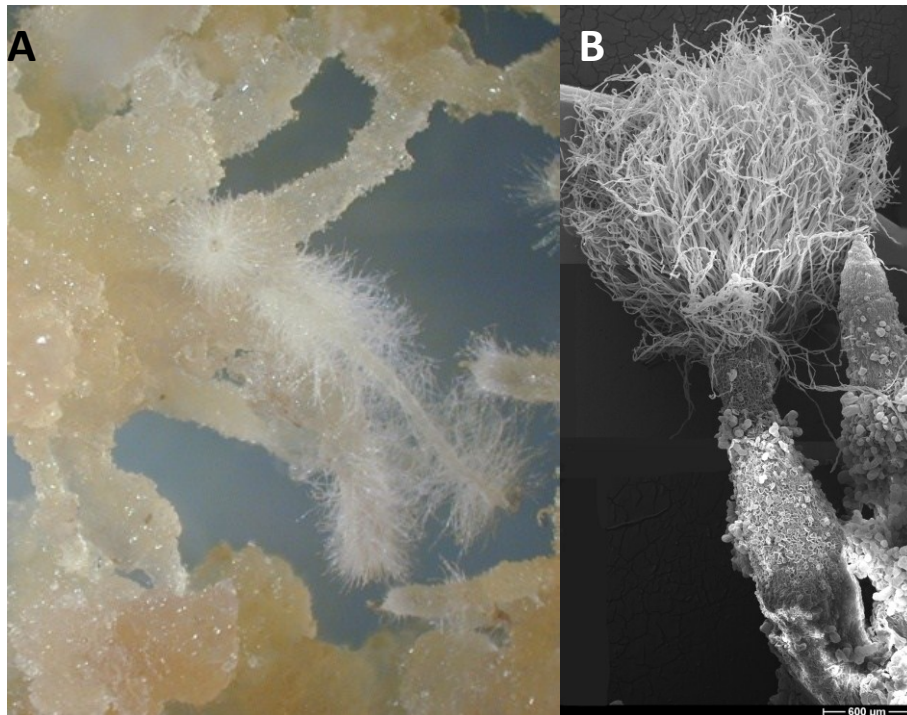
**18. ábra:** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott kallusza, ahol a kalluscsomóból sugárirányban zöld színű gyökerek (A) nőnek ki, és a gyökerek keresztmetszeti fénymikroszkópos képe (B). A nyilak a xilémelemek kezdeti differenciációját mutatják.



**19. ábra:** *C. adjarica* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott, zöld színű gyökeres kalluszának cortex sejtrétegéből származó elektronmikroszkópos képe; a: vakuolum, b: plasztisz, c: citoplazma, d: sejtfal; Beszúrt ábra a cortex régióból vett plasztisz tilakoid membránstruktúrája.

A sejtekre denz citoplazma (19. ábra), és nagyméretű plasztiszok jellemzőek, a plasztiszokban 3-6 tagú gránumok vannak.

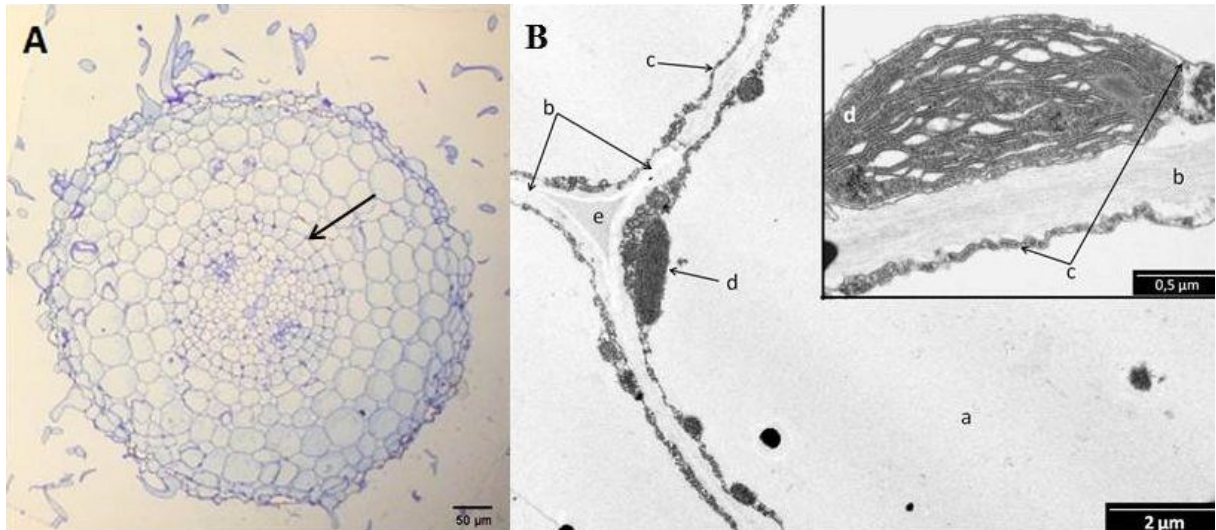
A *C. scabiosa* kalluszok egy része drapp színű, gyökérszőrökkel sűrűn borított differenciációs típusba sorolható. A vékony gyökéren fejlődő fehér gyökérszőrök hosszúak, sűrűn bebortják a gyökér kezdeményeket (20.a ábra).



**20. ábra:** *C. scabiosa* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott barna színű gyökérszerű struktúrát mutató kallusz (A) és pásztázó elektronmikroszkópos képe (B).

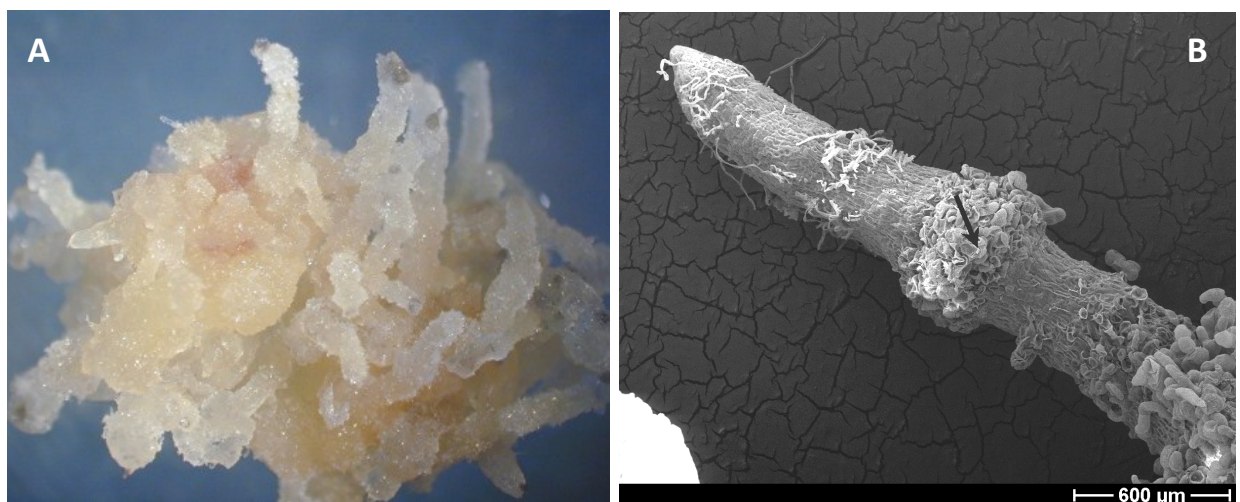
A *C. scabiosa* kalluszából fejlődő gyökér kezdemény struktúráltabb, mint a *C. adjarica* zöld színű kalluszán lévő gyökér kezdemények. Kívül gyökérszőrös rhizodermisz réteg határolja, a kortex sejtjei szorosabban kapcsolódnak egymáshoz, a központi hengerben jól láthatóak a differenciálódott xilém-nyalábok, a központi henger és a kortex határán lévő sejtsor, az endodermisz, elkülönül egymástól (21.a ábra, nyíllal jelölt sejtsor). A *C. adjarica* zöld színű kalluszához képest vékonyabb a sejtek citoplazmája (21.b ábra), a kloroplasztiszok tilakoidszerkezete fellazult.





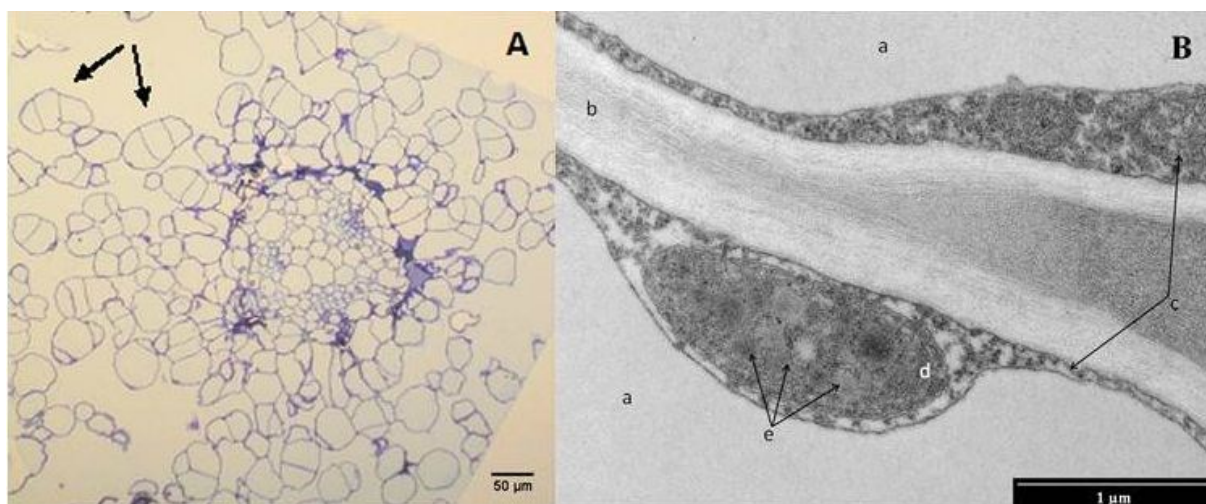
**21. ábra:** *C. scabiosa* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott drapp színű gyökeres kallusza fény- (A) (a nyíl az endodermist mutatja), és a kortex réteg egy sejtjének elektronmikroszkópos képe (B); a: vakuolum, b: sejtfal, c: sejtfalhoz simuló citoplazma, d: plastisz, e: intercelluláris; Beszúrt ábra a kortex réteg egy plastiszának finomszerkezete 4x-es nagyításban.

A *C. americana* gyökeres kalluszán megfigyelhető az a tendencia, miszerint az egyes gyökér kezdemények egy idő után visszakalluszosodnak (22.a ábra). A *C. americana* gyökér kezdeményéről készített scanning elektronmikroszkópos képen (22.b ábra) jól látható egy visszakalluszosodási centrum.



**22. ábra:** *C. americana* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott barna színű visszakalluszosodó gyökerei (A) és egy gyökér pásztázó elektronmikroszkópos képe (B); a fekete nyíl a gyökér kalluszosodó részét jelöli.

A *C. americana* gyökerének keresztmetszeti képen (23.a ábra) jól látszik, ahogy a kortex sejtei fellazulnak, és a kalluszsejtekre jellemző osztódási mintázatot mutatják. A dedifferenciáció kezdeti lépései elsőként a kortexsejteken mutatkoztak meg, két-három sejt együtt maradt, de az intercellulárisok mérete látványosan megnőtt a gyökeres kalluszokhoz képest, és a *C. solstitialis* kalluszához hasonlít. A központi henger még struktúrált. Az elektronmikroszkópos képen (23.b ábra) a kalluszosodó kortex sejtjeit láthatjuk, a kloroplasztisz mérete csökkent, tilakoidrendszere felbomlott és plasztoglobulusok fedezhetőek fel benne.



**23. ábra:** *C. americana* MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott barna színű kalluszosodó gyökér keresztmetszeti (A) és a külső kortex egyik dedifferenciálódott sejtjének transzmissziós elektronmikroszkópos (B) képe; az A képen a nyilak az osztódó kortex sejteket mutatják; a B képen a: vakuolum, b: sejtfall, c: citoplazma, d: plasztisz, e: plasztoglobulusok

#### V.4.3. Az *in vitro* kallusz kultúrák lignán összetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint az egyes kultúrák differenciálódott részeinek lignán tartalma

A kallusztenyészetek morfológiai vizsgálata után a tenyészetek lignán összetételét és mennyiségét vizsgáltuk. A hatóanyag-termelés és a differenciáció foka összefüggésben állhat (Wiermann 1981, Wink 1988), ezért az organizálódó kallusz tenyészetek gyökeres, illetve hajtásos struktúraiból mintát vettünk, külön-külön megvizsgáltuk a kallusztest és az organizálódó részek hatóanyag-termelését (8. táblázat).

Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a 8 *Centaurea* faj mindegyike, amelyből sikerült *in vitro* kallusz tenyészetet létrehozni, tartalmazott lignánokat. Az *in vitro* kallusz tenyészetek lignán összetétele és mennyisége egyes fajok esetében több

nagyságrenddel is eltért a termésekben kimutathatóaktól. Trachelosid és tracheloginin lignánok nem voltak jelen kimutathó mennyiségben.

Míg a *C. adjarica* termésében az arctiin, a matairesinol és az arctigenin volt mérhető, addig a kallusz tenyészetben matairesinosid, arctiin és arctigenin halmozódott fel. A fajon belüli differenciálódott tenyészetek közül a hajtásorganizálódott kallusz tartalmazta a legtöbb lignánt,  $4,4 \text{ mg g}^{-1}$ -ot. A gyökérorganizálódott kallusz összlignán tartalma is magas volt ( $2,75 \text{ mg g}^{-1}$ ), míg a nem organizálódóé  $1,33 \text{ mg g}^{-1}$  volt. A differenciációt nem mutató, és a hajtásorganizáció irányába elindult tenyészetek a legnagyobb mennyiségben lignán glikozidot tartalmaztak. A gyökérorganizációt mutató tenyészetben jelentős mennyiségű arctigenin halmozódott fel, amely az összlignán tartalom majdnem 70%-a. A *C. adjarica* hajtásorganizálódott tenyészete tartalmazta az *in vitro* tenyészetek között a legtöbb lignánt.

A *C. americana in vitro* tenyészetében mind a 4 lignán kimutatható volt, amiket a termésben is kimutattunk, de mennyiségük elmaradt a termésekben mértektől. Míg a termésben  $53,6 \text{ mg g}^{-1}$  arctiin halmozódott fel, addig a kalluszban  $0,16 \text{ mg g}^{-1}$  volt mérhető, amely két tizedes mennyiségcsökkenést jelent. A gyökérorganizációt mutató tenyészetben az összlignán tartalom 75%-a arctigenin volt, de ez a mennyiség csupán 15%-a volt a *C. adjarica* gyökeres kalluszában mértnek.

A *C. calcitrapa* termésében megtalálható matairesinosid, arctiin és arctigenin lignánok helyett a kallusz arctiint nem, helyette viszont matairesinolt tartalmazott,  $1,18 \text{ mg g}^{-1}$  mennyiségben. Az összlignán mennyiség 66%-a matairesinol az *in vitro* tenyészetben.

A *C. cyanus* termésében csak az arctiin fordult elő kimutatható mennyiségben, míg az *in vitro* tenyészet tartalmaz matairesinosidot ( $0,11 \text{ mg g}^{-1}$ ), arctiint ( $2,88 \text{ mg g}^{-1}$ ), és nagyon kevés arctigenint ( $0,02 \text{ mg g}^{-1}$ ) is. A differenciációt nem mutató *in vitro* tenyészetek közül az arctiin ebben a tenyészetben fordult elő a legnagyobb mennyiségben, amely az összlignán tartalom 95%-a.

A *C. jacea* kallusza és hajtásorganizációt mutató kallusza, valamint a termése között eltérések mutatkoztak, mind a lignán összetétel, mind a mennyiség terén. Az összlignán tartalmat tekintve az *in vitro* kultúrák egy, illetve két nagyságrenddel kevesebb lignánt tartalmaztak. Az *in vitro* kultúrák közül a nem organizálódott kallusz tartalmaz több lignánt ( $1,2 \text{ mg g}^{-1}$ ), a hajtás organizációt mutató kalluszhoz képes ( $0,58 \text{ mg g}^{-1}$ ).

A lignán összetétel tekintetében a differenciálódott kalluszban mind a két lignán glikozid-aglikon pár kimutatható volt, míg a differenciációt nem mutató tenyészetben a



matairesinol nem volt jelen. A termések ezzel szemben arctiint, az aglikonját, és matairesinolt tartalmaztak.

A *C. montana* kallusz tenyésztete lignán összetételében szintén eltért a termés lignán összetételétől, mivel a kallusz tenyésztet tartalmazott matairesinosidot is, de az arctiin nem volt kimutatható. A termésben, a legnagyobb mennyiségben az arctiin fordult elő. A matairesinol és az arctigenin nagyobb mennyiségben volt jelen az *in vitro* tenyésztetben ( $0,39 \text{ mg g}^{-1}$  és  $0,27 \text{ mg g}^{-1}$ ), mint a termésben.

A *C. scabiosa in vitro* tenyésztetének organizálódó és nem organizálódó kallusz tenyészteteinek lignán összetétele eltért egymástól. A gyökér organizációt mutató kallusz matairesinosidot, arctiint, és arctigenint tartalmazott, és a differenciálódott kallusz összlignán tartalma is nagyobb volt ( $2,34 \text{ mg g}^{-1}$ ), míg a differenciációt nem mutató kultúra csupán matairesinosidot és arctiint tartalmazott. Mindkét kultúrában, a legnagyobb mennyiségben, a matairesinosid volt jelen. A *C. scabiosa* terméseiben is a legnagyobb mennyiségben matairesinosid fordult elő, melynek mennyisége egy nagyságrenddel nagyobb volt az *in vitro* kultúrákban mérteknél.

A *C. solstitialis* termésében kimutatható 2 lignán glikozid-aglikon pár a kallusz kultúrában is kimutatható volt, az összlignán tartalom azonban csupán a 10% a termésben mérthez képest. Ennek a kultúrának volt a legmagasabb az arctigenin tartalma ( $0,28 \text{ mg g}^{-1}$ ), a differenciációt nem mutató kultúrák között.

Az összlignán tartalom szempontjából a *C. adjarica* hajtás-differenciációt mutató kallusza tartalmazta a legtöbb lignánt,  $4,4 \text{ mg g}^{-1}$ -ot. Szintén ez a kallusz kultúra tartalmazta a legtöbb arctiint is,  $2,96 \text{ mg g}^{-1}$ -ot. A *C. adjarica* gyökérdifferenciációt mutató kallusz kultúrája pedig a legtöbb arctigenint,  $1,92 \text{ mg g}^{-1}$ -ot.

A legtöbb matairesinosid,  $2,28 \text{ mg g}^{-1}$ , a *C. scabiosa* gyökeres kalluszában fordult elő.

A *C. calcitrapa in vitro* kultúrája tartalmazta a legtöbb matairesinolt,  $1,18 \text{ mg g}^{-1}$ -ot.

**8. táblázat** *Centaurea* fajok MSA30 táptalajon, természetes fényen fenntartott *in vitro* kultúráinak lignán összetétele és mennyisége HPLC-UV készülékkel mérve, száraz tömegre vonatkoztatva, az organizálódó kalluszcsoporttal együtt.

| Fajok→         | <i>C. adjarica</i> |            |             | <i>C. americana</i> |             | <i>C. calcitrapa</i> | <i>C. cyanus</i> | <i>C. jacea</i> |             | <i>C. montana</i> | <i>C. scabiosa</i> |             | <i>C. solstitialis</i> |
|----------------|--------------------|------------|-------------|---------------------|-------------|----------------------|------------------|-----------------|-------------|-------------------|--------------------|-------------|------------------------|
|                | kallusz            | hajtás     | gyökér      | kallusz             | gyökér      |                      |                  | kallusz         | hajtás      |                   | kallusz            | gyökér      |                        |
| Ligánok ↓      |                    |            |             |                     |             |                      |                  |                 |             |                   |                    |             |                        |
| Matairesinosid | 0,77               | 0,17       | 0,16        | 0,04                | -           | 0,56                 | 0,11             | 0,32            | 0,09        | 1,51              | 1,58               | 2,28        | 0,15                   |
| Arctiin        | 0,49               | 2,96       | 0,67        | 0,16                | 0,09        | -                    | 2,88             | 0,77            | 0,36        | -                 | 0,16               | 0,05        | 0,11                   |
| Matairesinol   | -                  | -          | -           | 0,08                | -           | 1,18                 | -                | -               | 0,02        | 0,39              | -                  | -           | 0,03                   |
| Arctigenin     | 0,07               | 1,27       | 1,92        | 0,15                | 0,27        | 0,04                 | 0,02             | 0,11            | 0,11        | 0,27              | -                  | 0,01        | 0,28                   |
| Összlignán     | <b>1,33</b>        | <b>4,4</b> | <b>2,75</b> | <b>0,43</b>         | <b>0,36</b> | <b>1,78</b>          | <b>3,01</b>      | <b>1,2</b>      | <b>0,58</b> | <b>2,17</b>       | <b>1,74</b>        | <b>2,34</b> | <b>0,57</b>            |

Jelmagyarázat: - nem detektálható; az adatok a lignán mennyiséget mutatják  $\text{mg g}^{-1}$  SzT-re vonatkoztatva; az RSD% 0,5 és 10,8 között változott.

## VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A növények hatalmas forrást jelentenek olyan új, gyógyászatilag igen fontos hatóanyagok felfedezésében, melyeket a gyógyszeripar is hasznosítani tud. A gyógynövények a világ lakosságának nagyobbik részének a mai napig az életmentő készítmények forrásai. A fenntartható fejlődés érdekében a növényi sejtenyészetekkel való természetes vagy rekombináns anyagok előállítása iránt az utóbbi évtizedben világszerte megnőtt az érdeklődés (Canter és mtsai. 2005).

A növényi másodlagos anyagcseretermékek szerepe, melyek közül csak kevésre derül fény, az egyre növekvő érdeklődésnek köszönhetően lassú ütemben, de folyamatosan tisztázódik. Megjelenésük az alkalmazott kutatásban, az egyes betegségek kezelésében, nem újdonság, az 1850-es évek óta intenzíven kutatják ezeket a vegyületeket (Hussain és mtsai. 2012).

Ezen anyagcseretermékek biológiai tulajdonságainak felismerése táplálta a kutatók e terület iránti folyamatos érdeklődését, nevezetesen az új gyógyszerek, antibiotikumok, rovarölők keresését, felfedezését (Hussain és mtsai. 2012).

A lignánok iránt is, melyek a kb. 8000 vegyületet tartalmazó fenolok csoportjába tartoznak, igen fokozott az érdeklődés. Ennek az érdeklődésnek a motorja, kétség kívül az, hogy a lignánokat, mint gyógyszeripari terméket, lehessen felhasználni egészségmegőrző vagy terápiás céllal (Harmatha és mtsai. 2011).

Közülük is kiemelkedőek az arctigenin, a matairesinol, a trachelosid, és glikozidjaik biológiai hatásáról szóló ismeretek (lásd Irodalmi bevezető II.4 fejezet). Munkánk során célul tűztük ki ezen lignánok bioszintézis változásának nyomon követését precíz analitikai módszerek segítségével különböző növényi mintákban, illetve, a különböző élettani jelenségekkel párhuzamosan zajló hatóanyag változások nyomon követését a termés érése és csírázása, illetve *in vitro* a sejtenyészetek növekedése, differenciációja során, annak érdekében, hogy nagy mennyiségben rendelkezésre álljanak további kutatások, kutatásaink céljából.

A növényvilág számos taxonómiai csoportja tartalmaz lignánokat (lásd Irodalmi bevezető 1. táblázat). A különböző fajokban az egyes lignánok azonosítását követően azonban a kutatók többsége nem vizsgálja a fajokban mérhető lignán mennyiséget, amely azonban igen eltérő lehet (lásd Irodalmi bevezető 3. táblázat), mind az egyes nemzetségek, mind pedig az egyes fajok, vagy akár fajták között is (Sedlák és mtsai. 2008).

A Növényyszervezettani Tanszék Biotechnológiai laborja hosszú évek óta foglalkozik növényi másodlagos anyagcseretermékekkel, úgy, mint az alkaloidokat és lignánokat tartalmazó és *in vitro* kultúrában is termelő növényekkel. Ezek a növények számos családból kerültek ki, például a *Convulaceae* (Páska és mtsai. 1999), *Oleacea* (Sedlák és mtsai. 2008), és *Asteraceae* (Szokol-Borsodi és mtsai. 2012). Az egyes fajok, mint növényi minta, kiválasztásánál fő szempont volt, hogy a lignánokat lehetőség szerint tiszta formában, nagy mennyiségben tartalmazzák, illetve, hogy a fajok lignán tartalma, sejtkultúrájának létrehozása, és ezek lignán termelése az irodalomban újdonságként szerepeljenek. Ezek a szempontok egyfelől előnyösek, hiszen új adatokkal szolgálhatnak, másfelől viszont a kapott eredmények más kutatócsoportok eredményeivel való összevetésében okozhatnak nehézségeket.

Annak ellenére, hogy a növényi minta az egyes kutatások során eltérő volt, az alkalmazott módszerek, táptalajok nem különböztek egymástól. A korábbi sikerek reményében választottuk munkánk tárgyául a *Centaurea nemzetség* 11 fajtát, illetve a magas lignán tartalmuk miatt az *Arctium lappa*, és *Cirsium arvense* fajokat. Mivel elenyésző azon irodalmaknak a száma, ahol valamely *Centaurea* fajból kallusz tenyészet létrehozásáról számoltak be (Lourenco és mtsai. 2002, Vidal és mtsai. 2004, Alaiwi és mtsai. 2012), és lignán mennyisége már igazolva lett volna (Christensen és Lam 1991, Bruno és mtsai. 1991, Ferguson és mtsai. 2003), perspektivikusnak tűnt ezzel a nemzetséggel folytatott munka. Az *in vitro* tenyészetek létrehozásának, fenntartásának kiindulópontjaként a laborban korábban alkalmazott Murashige-Skoog táptalajt választottuk.

A lignánok azonosítására és mennyiségi meghatározására olyan analitikai berendezéseket alkalmaztunk, melyek (HPLC-MS, HPLC-UV) az irodalomban széles körben elterjedtek precizitásuk miatt (Willför és mtsai. 2006).

## **VI.1. A lignánok azonosítása és mennyiségi meghatározása**

### **VI.1.1. A lignánösszetétel folyadékkromatográfiás meghatározása**

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa*, és a *Cirsium arvense* terméseiben megtalálható lignánok azonosítása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztásuk után tömegspektrometriás (MS) detektálással, mennyiségi meghatározása pedig ultraibolya spektrofotometriával (UV) történt (Sedlák és mtsai. 2008, Boldizsár és mtsai. 2010a, Boldizsár és mtsai. 2010b).

A tömegspektrometriás detektálások során megállapítható volt, hogy mindegyik vizsgált lignán esetében a vízzel képzett adduktok ( $[M+H_2O]^+$ ) és a protonált ionok ( $[M+H]^+$ ) voltak a legnagyobb intenzitásúak, tömegspektrumjaik alapján.

A növényi mintákban a lignánok azonosítása standardokkal egyező retenciós idejük (arctiin, matairesinol, arctigenin) és tömegspektrometriás jellemzőik alapján történt (Eredmények 4. és 5. ábra). Ez a módszer alkalmasnak bizonyult egy mintából, egyszerre több lignán glikozid-aglikon pár azonosítására, és mennyiségi meghatározására.

A növényi minták lignánösszetételét nemcsak intakt formában, de savas és enzimés hidrolízist követően is megvizsgáltuk, ezzel igazolva a glikozid-aglikon párok azonosságát különböző körülmények között. Az eredmények azt mutatták, hogy a vizsgált lignán glikozidokról a glükóz lehasadásával képződő aglikon jele megnőtt a spektrumban, és az adott glikozidnak megfelelő aglikon keletkezett. Mennyiségi meghatározásukat követően megállapítottuk, hogy az átalakulás teljes mértékű, mennyiségi volt. A kapott eredmények azt igazolták, hogy a dibenzilbutirolakton lignánok savas hidrolízist követően is stabilak maradtak. A hidrolizált minták vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a glikozid-aglikon átalakulás teljes egészében végbement.

## **VI.2. A lignánösszetétel változása a termés érése és csírázása során**

### **VI.2.1. A lignánösszetétel változása a termésérés során**

A *Cynareae* nemzetség csoport három fajánál a termés érési fázisaiban, a teljes virágzás állapotától (RS-1) az érett termés állapotáig (RS-4) követtük nyomon a hatóanyagok mennyiségi változását HPLC-UV készülékkel (lásd Eredmények 8. ábra, RS-1-től RS-4-ig).

Az adott állapot termésében előforduló arctiin (lásd 8.a ábra), matairesinosid (lásd 8.b ábra), és trachelosid (lásd 8.c ábra) mennyiségének összehasonlításaként kapott eredményekből megállapítható, hogy a lignánok mennyisége jelentősen növekedett az érés első (RS-1) és harmadik (RS-3) fázisa között az *Arctium lappa* és *Cirsium arvense* fajok esetében, míg a *Centaurea scabiosa* esetében az első (RS-1) és második (RS-2) fázis között.

Mindhárom faj esetében megállapítottuk, hogy a lignán aglikonok mennyisége igen alacsony volt, a glikozidok mennyiségéhez viszonyítva. Az irodalomban leírtakkal összhangban (Groyne és mtsai. 1999) a szamóca (*Fragaria x ananassa* cv. *Elsanta*) érése során is folyamatos a  $\beta$ -glikozidok felhalmozódása, egészen az érett gyümölcs állapotig. Az egyes érési stádiumokat vizsgálva Groyne és munkatársai megállapították, hogy a zöld színű

termésben semmilyen, általuk vizsgált hatóanyagot nem tartalmazott, míg a teljesen érett termésben mindegyik anyagcseretermék nagy mennyiségben halmozódott fel.

A lignán glikozidok izolálására az *Arctium* és *Cirsium* fajok harmadik fázisú éretlen termései voltak a legmegfelelőbbek, míg a *Centaurea* termésekből már a második fázis elérése után is szinte az érett termésben található lignán tartalom volt kinyerhető. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy a lignán glikozidok izolálásához nem kell megvárni, míg a termések elérik a teljesen érett állapotot, természetes begyűjtésük megkezdődhet már az érett állapot előtt, így könnyítve a termések begyűjtését.

#### **VI.2.2. A lignánösszetétel változása a csírázás során és a lignánok megoszlása a kaszattermés termésfala és az embrió részei között: natív, csíráztatott, és glikozidáz enzimmel hidrolizált minták**

Az *Arctium lappa*, a *Centaurea scabiosa* és a *Cirsium arvense* fajoknál 4 állapoton keresztül követtük, HPLC-UV készülékkel, a csírázás folyamatát a hatóanyagok kinyerésének optimalizálása szempontjából.

Megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált fajok közül a csírázás során egyik fajban sem változott sem a lignán glikozidok, sem az aglikonok mennyisége (lásd Eredmények 9.a-c. ábra, GS-1 érési állapottól GS-4 csírázási állapotig).

Eddigi eredményeink azt mutatták, hogy a lignán glikozidok igen nagy mennyiségben jelennek meg az érett termésekben, és a csírázási folyamat végén sem változott a mennyiségük. Szerettük volna azonban pontosítani, hogy a termés egyes részeiben milyen arányban halmozódnak fel a lignánok. Korábbi irodalmi adatokra támaszkodva (Dános 2007) szétválasztottuk az érett terméseket (GS-1) a kemény, fásodott termésfalra, és az embrió részre. A termések részekre választása nehézkes, de csírázásakor (GS-4) a természetben is lezajlik.

A termések mindkét részében megállapítottuk a lignánok összetételét és mennyiségét a natív és  $\beta$ -glikozidáz enzim hidrolízisét követően is (lásd Eredmények 6. táblázat). A lignánösszetételt vizsgálva megállapítottuk, hogy a hatóanyagok legnagyobb mennyiségben a termések embrió részében halmozódtak fel a natív mintákban. A minták (GS-1, GS-4) enzimatis hidrolízisét követően megállapítottuk, hogy az *Arctium* és a *Cirsium* fajokban felhalmozódott glikozid lignánok teljes mértékben a megfelelő aglikonná hidrolizáltak, ezzel szemben a *C. scabiosa* éretett termése az GS-1 állapotban nem. A *Centaurea* termésében felhalmozódott matairesinosid csak a csírázás folyamata után alakult át matairesinollá

enzimatis hidrolízist követően. A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy a *C. scabiosa*  $\beta$ -glikozidáz enzime a termés érése során inaktív, míg csírázás hatására aktiválódik, ezzel lehetővé téve a matairesinol nagy mennyiségű izolálását enzimatis hidrolízissel (Szokol-Borsodi és mtsai. 2012).

A hatóanyag izolálására megfelelő kiindulási anyag a csíráztatott termés, mivel a lignánok igen nagy arányban (*A. lappa* 89%, *C. scabiosa* 79,5%, *C. arvense* 86,3%; lásd 6. táblázat) az embrió részben halmozódnak fel, tehát magas a lignán koncentráció a kiindulási anyagban, amely ideális az izolálás szempontjából. Mivel a termésfal igen sok olyan anyagot tartalmaz, amely zavarhatja a lignánok HPLC-UV készülékkel történő vizsgálatát, az izolálás szempontjából előnyös, hogy a csírázás során természetes úton elváljon az embrió a termésfaltól (lásd Eredmények 10. ábra), megkönnyítve ezzel a hatóanyagok kivonását.

A hatóanyagkinyerés optimalizálásának érdekében végzett vizsgálatok eredményeként megállapítottuk, hogy a lignán glikozidok kinyerésére az éretlen (RS-3 érési állapot) termések, míg a farmakológiai szempontból előnyösebb lignán aglikonok kinyerésére az termés embrió része, a csírázás végére a termésfaltól teljesen különvált, emzimatis hidrolízist követően a legalkalmasabb.

### **VI.3. A *Centaurea* fajok terméseinek lignánösszetétel vizsgálata**

#### **VI.3.1. A natív minták lignánösszetétele**

A korábbi irodalmi eredmények, melyek a *Centaurea* fajok lignánösszetételét vizsgálták (Irodalmi bevezető 2. táblázat), leginkább a fajokban található lignánok minőségi meghatározására törekedtek (lásd Irodalmi bevezető II.6.2 fejezete). Ezért munkánkban a lignánok összetételét, mennyiségét részleteiben vizsgáltuk, HPLC-UV és HPLC-ESPI-MS készülékekkel (lásd Eredmények 7. táblázat) *Centaurea* fajok terméseiben.

Az általunk vizsgált fajok terméseinek mindegyike tartalmazott lignánokat, de az egyes fajok között mind az összetételben, mind a mennyiségben igen nagy eltéréseket tapasztaltunk. Az összlignán tartalom szintén igen változatos képet mutatott.

Megvizsgáltuk az egyes lignánok előfordulását a fajokban, és megállapítottuk, hogy mindegyik faj termése tartalmazott arctiint, amely 2 fajt (*C. scabiosa* és *C. solstitialis*) kivéve, a legnagyobb mennyiségben volt jelen a natív mintákban. Trachelosidot csak 2 fajnál (*C. pannonica* és *C. scabiosa*) tudtunk detektálni, nagyon kis mennyiségben, trachelogenin viszont egy mintában sem volt jelen detektálható mennyiségben. Az általunk vizsgált fajokban mért lignán összetételt összevetve az irodalomban leírtakkal egyezést találtunk, lásd

Irodalmi bevezető 2. és 3. táblázat, de a lignán mennyiségére már sajnos nem áll rendelkezésünkre elegendő, megfelelő forrás.

Az egyes lignán glikozidok izolálására a következő fajok voltak a legalkalmasabbak. Az arctiin a legnagyobb mennyiségben a *C. calcitrapa* termésében volt jelen ( $59,6 \text{ mg g}^{-1}$ ), viszont vizsgálataink alapján az *Arctium lappa* termése ( $73,9 \text{ mg g}^{-1}$ ) többet tartalmazott (Boldizsár és mtsai. 2010a), így arctiin izolálására ez a faj volt a legalkalmasabb. Arctigenint a *C. dealbata* intakt termése tartalmazott ( $2,57 \text{ mg g}^{-1}$ ) a *Centaurea* fajok között a legnagyobb mennyiségben, az *A. lappa* termése viszont  $2,73 \text{ mg g}^{-1}$ -ot. Arctigenin izolálásra legalkalmasabb az *A. lappa* enzim hidrolizált mintája, mivel ennek a módszernek a segítségével  $54,5 \text{ mg g}^{-1}$ -ot nyerhetünk ki. A kapott eredmények alapján matairesinosidot a *C. scabiosa* terméséből lehet a leggazdaságosabban izolálni,  $41,7 \text{ mg g}^{-1}$ -ot. A vizsgált fajok esetében a trachelosid tartalom egyik fajban sem jelentős, szemben a vizsgált *Cirsium arvense*-nél ( $14,1 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Boldizsár és mtsai. 2010b), így az izoláláshoz ennek a fajnak az érett termése a legideálisabb, enzimes hidrolízist követően pedig trachelogenint tudtunk nagy mennyiségben kinyerni a termésből.

A termésekben előforduló lignánok összetétele és mennyiségi meghatározása igen fontos információval szolgál az *in vitro* kallusz kultúrák létrehozásához.

Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált összes *Centaurea* faj termése tartalmazott lignánokat, és a termések összetétele jelentősen különböző volt. Arctiin mindegyik fajban azonosításra került, de ennek mennyisége nagy eltérést mutat a fajok között [ $(0,42 \text{ mg g}^{-1})$ -tól (*C. cyanus*)  $73,2 \text{ mg g}^{-1}$ -ig (*C. dealbata*)]. Matairesinosid legnagyobb mennyiségben a *C. scabiosa* termésében fordult elő.

A vizsgált fajokat 4 csoportba tudtuk osztani a glikozid-aglikon párok előfordulása/mennyisége szerint. Az első típusba azok a fajok tartoztak, amelyekben az arctiin/arctigenin (hidrolizálatlan/hidrolizált mintában) fordult elő nagyobb mennyiségben (*C. adjarica* → *C. pannonica* fajok ebben a sorrendben a 7. táblázatban). A második csoportot a matairesinosid-matairesinol lignán párt legnagyobb mennyiségben (hidrolizálatlan/hidrolizált mintában) felhalmozó *C. scabiosa* jelenti. Ezekkel szemben a *C. solstitialis* hasonló mennyiségben tartalmazta az arctiin matairesinosid glikozidokat és ezek aglikonjait is a hidrolizálatlan kivonatában, így ezt egy 3. típusnak tekinthetjük. A táblázatban szereplő három utolsó faj (*C. cyanus*, *C. montana* és *C. triumfetti*) pedig nagyon alacsony lignántartalmával tűnt ki (4. típus) A kapott eredmények felvetik annak a gondolatát, hogy kapcsolat lehet a *Centaurea* fajok hagyományos rendszertani besorolása és lignánösszetétele



között, azaz, a lignánok kemotaxonómiai szerepének tanulmányozását. Ehhez azonban további *Centaurea* fajok bevonása szükséges.

### **VI.3.2. A hidrolizált minták lignánösszetétele**

A kapott eredményekből megállapítottuk, hogy a mintákban hidrolízist követően a lignán glikozidokból a megfelelő aglikonok keletkeztek. A módszer alkalmazása megkönnyíti a lignán aglikonok izolálását olyan mintákból, melyekben a termés nagy mennyiségű glikozidot tartalmaz. Például arctigenint a legnagyobb mennyiségben az *A. lappa* terméséből nyerhetünk hidrolízis után. A *C. scabiosa* termését kivéve, mindegyik vizsgált faj termésében végbement a glikozidok enzimatis hidrolízist követő aglikon átalakulása. Matairesinol izolálásra legalkalmasabb a *C. scabiosa* savas hidrolizált mintája, melyből 38,1 mg g<sup>-1</sup> nyerhető.

### **VI.4. A *Centaurea* fajok szövettanyészeteinek létrehozása, lignán összetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint morfológiája**

A *Centaurea* fajok kedvező hatóanyag-tartalma (lignánok, flavonoidok, flavonolok, poliacetilének, stb.) régóta ismert, sok irodalmi adat található a különböző *Centaurea* fajok hatóanyag-termeléséről, a négy általunk vizsgált lignán tekintetében is.

Az eddigiekben felsorolt kutatások mind leveles hajtások, ill. termések lignántartalmáról szólnak, a *Centaurea* fajok *in vitro* kutatásáról kevés irodalmi adat szól. *C. calcitrapa*-ból hoztak létre *Agrobacterium*-mal transzformált hairy root tenyészeteket (Loureço és mtsai. 2002), *C. cyanus* (Kakegawa és mtsai. 1987) és *C. solstitialis* (Vidal és mtsai. 2004) fajokból pedig sejttenyészeteket, de ezek a kutatások nem a hatóanyag termeléshez kapcsolódtak. A hairy root tenyészetet a sajtgyártáshoz szükséges kenprozin termeltetésére, a *C. cyanus* szuszpenziókat antocianin termelés tanulmányozására hozták létre. Az Amerikában invazív gyomnak számító *C. solstitialis* sejttenyészetek segítségével kerestek a faj megfékezésére alkalmas gombafajt.

Az *in vitro* kultúrákkal való munka során számos nehézségbe ütközik a kutató, melyek például a steril körülményekhez szükséges eszközök megléte, illetve fenntartási költsége. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy a kapott eredmények kiértékelésénél, az intakt növényekéhez viszonyítva, az *in vitro* tenyészetek esetében nagyobbak az irodalomban megjelent szórás értékek vagy az eredményeket tág intervallumként közlik, és nem határoznak meg elkülönülten szórást (Schmitt és Petersen 2002).

Fontos szempont, hogy az intakt növényben bár különböző is lehet a levelek mérete, de életkoruk megegyezik, ezért az ilyen típusú mintákból kapott eredmények jóval pontosabbak. Ezzel szemben az *in vitro* kultúra sejtjei heterogén eredetűek, és bár egyforma volt a kísérletsorozatban a táptalaj, a fény, a hőmérséklet, de az egyes sejtek kora egy tenyészetben belül is igen variálhat, valamint a tápanyagok hozzáférhetősége is eltérő lehet. Ezen körülmények együttese eredményezheti a nagyobb szórásértékeket, és az eredmények igen tág intervallumban való előfordulását.

#### **VI.4.1. A *Centaurea* fajok szövettenyészetének létrehozása**

Mivel a szövettenyészetek függetlenek a klimatikus és szezonális hatásoktól, tenyésztésük pontosan ismert és szabályozott körülmények között zajlik, mindezek mellett a hatóanyagok kivonása is könnyebb, mint az intakt növényből, ezért sikeresen *in vitro* tenyészeteket hoztunk létre nyolc *Centaurea* fajból. Ezek közül a fajok közül a *C. adjarica*, *C. americana*, és *C. scabiosa* fajok esetében még nem írtak le *in vitro* tenyészet létrehozását.

A három faj, amelyből nem sikerült primer kalluszt létrehozni a *C. dealbata*, a *C. triumfetti* és a *C. pannonica* voltak. Gamborg B5 kalluszosító táptalajon nem indult meg e három fajnál a primer kallusz képződés, többszöri próbálkozásra sem.

Ahhoz, hogy ezekből a sejttenyészetekből nagy mennyiségben lehessen a hatóanyagokat kivonni, a sejttenyészetet először folyadék, úgynevezett szuszpenziós kultúrában, majd fokozatos léptéknövelés után nagyteljesítményű fermentorokban kell szaporítani. Ennek érdekében tett próbálkozásaink azonban nem jártak sikerrel, ugyanis egyik faj szekunder kallusz tenyészetéből sem tudtunk szuszpenziós kultúrát létrehozni. További terveink között szerepel e kultúrák létrehozása, amellyel a lignánok nagy mennyiségű előállítását tennénk lehetővé.

#### **VI.4.2. Az *in vitro* kallusz kultúrák differenciációja**

A nyolc *Centaurea* fajkból indított szekunder kalluszokat MSA30 táptalajra helyeztük fenntartás céljából. Azt tapasztaltuk, hogy az egyes genotípusok eltérő módon reagáltak a táptalajra.

Az egyes fajok *in vitro* kultúrái között tapasztalt különbségek között a legnyilvánvalóbb a morfológiában jelentkezett. Egyes fajok hajtásszerű (*C. jacea*), hajtás- és gyökérszerű (*C. adjarica*), mások csak gyökérszerű (*C. americana* és *C. scabiosa*) szerveket

képeztek, míg pl. a *C. solstitialis* nem mutatott organizációs hajlamot és tipikus kallusz állapotban maradt, a többi, fel nem sorolt faj kallusz tenyészetéhez hasonlóan (lásd Eredmények V.4.3 fejezet).

A *C. adjarica* sejttenyésztete igen heterogén képet mutatott, egy Petri csészén belül, ugyanazon a táptalajon, különbözőképpen differenciálódott szövetek alakultak ki. A hajtás és gyökérszerű struktúrák kialakulása többek között a táptalajban lévő, és a növényi sejtekben előforduló hormonok, és azok koncentrációjának is köszönhető. E mellett egyéb külső (fény intenzitás, megvilágítási periódus), és belső (polaritás hiánya a sejttenyésztetben) faktorok, illetve ezek összessége, is befolyásolták a sejtek differenciációs irányát. A sejttenyésztet heterogén morfogenezise jól mutatja a növényi sejtek totipotenciáját, és azt, hogy a sejtek egy olyan rendszer részei, amelyben ugyanolyan környezetben az egyes sejtek akár eltérő módon is reagálni tudnak.

Az a jelenség, hogy a *C. adjarica* és *C. scabiosa* gyökérorganizációt mutató zöld és drapp tenyésztete a fénymikroszkópos felvételek alapján (Eredmények 18. és 21. ábra) egyértelműen gyökér struktúrájú, nem szokatlat, bár ezek nem valódi szervek, ugyanis kloroplasztisz is található bennük. Flores és munkatársai (1993) az *Asteraceae* és *Solanaceae* nemzetség egyes fajainak hairy root tenyésztetében vizsgálták a zöld gyökerek fotoszintézisét, és fotoautotrófiás növekedését. Azt tapasztalták, hogy a *Bidens sulfurea* hairy root kultúrái anatómiailag gyökerek voltak, eközben CO<sub>2</sub>-ot fixációt és Rubisco aktivitást mutattak, amelyek egyértelműen a fotoszintézisre utalnak. A tenyésztet gyorsabban növekedett fényen tartva, mint sötétben.

A *C. americana* gyökérorganizációt mutató kultúrájáról készített felvételek jól szemléltetik a dedifferenciáció folyamatát. E faj sejttenyésztetére is jellemző a gyökérszerű struktúra, de a cortex sejtek fellazultak, újra osztódásnak indultak, és a bennük található plasztiszokban a tilakoidrendszer felbomlott. A plasztoglobulusok (lipoprotein raktár) megjelenése a tilakoidrendszer felbomlására utal. Nagy számban öregedő plasztiszokban, illetve kromoplasztiszokban fordulnak elő (Kessler és Vidi 2007).

Közismert, hogy kallusz tenyésztetekben lévő sejtek nem homogének sem morfológiailag, sem fiziológiailag, sem genetikailag, melynek következménye, hogy a táptalajban előforduló hormonkoncentrációra más és más lesz az egyes sejtek válaszadó képessége, kompetenciája. Egyes sejtek kompetensek lesznek, és elindulnak az organogenezis irányába (lásd Eredmények 14. ábra), más sejtek viszont nem (lásd Eredmények 12. ábra).

Ezzel párhuzamosan, igen nagymértékben befolyásolja még az organogenezist a sejtek endogén hormonszintje is (Gaspar és mtsai. 1996).

Azok a sejtcsoportok, amelyek megmaradnak kallusz állapotban, továbbra is ekválisan osztódnak (Eredmények 12. ábra), azonban azok a sejtek, amelyek kompetenssé válnak, és a morfogenezis útjára lépnek, először mindig inekválisan osztódnak (Eredmények 17. ábra), és a sejt genetikai programja megváltozik az endogén hormonok hatására. Ez a fajta regeneráció, szemben az embriógenezissel, nem egy sejtől indul ki, hanem egy több sejtől álló sejtcsoportból, amire az jellemző, hogy a random osztódási síkok helyett egy tengely alakul ki, amely a későbbi osztódási síkkal megegyező. Így alakul ki a későbbi hajtástengely vagy gyökértengely.

Az MSA30 táptalajban lévő hormonok ( $2 \text{ mg g}^{-1}$  NAA és  $0,2 \text{ mg g}^{-1}$  kinetin) együttesen befolyásolhatták a sejtenyészetek differenciációját. Az alkalmazott hormon kombináció valószínűleg elősegítette a kallusz kultúrákban a sejt differenciációt, ami közvetetten fokozhatta a lignán termelést is. Viszont a sejttömeg-gyarapodás arra utalt, hogy ezzel párhuzamosan a sejtprolifерációt is serkentette ez a hormon kombináció. A hatóanyagok termeltetésére használt növényi sejtenyészeteknél általában az tekinthető optimálisnak, ha viszonylag magas sejtprolifерáció mellett viszonylag magas sejt differenciációt érnek el a gazdaságos termelés érdekében (Payne és mtsai. 1987, Sajc és mtsai. 2000).

A fény intenzitása és a megvilágítási idő is befolyásolhatja az organogenezist, és a lignán termelést a növényi sejkultúrákban, illetve a megfelelő fény-sötét megvilágítási periódus nagyobb mértékben képes fokozni a sejtenyészetek hatóanyag-termelését, mint a folyamatos megvilágítás, emellett energiatakarékosabb és gazdaságosabb is (Uwe Fischer és Alfermann 1995).

Összességében elmondható, hogy a különböző fajok ugyanarra a táptalajra eltérő módon reagáltak, különböző differenciálódási módok indultak el a tenyészetekben, valamint egy tenyészetben belül is differenciálódási utak jelentek meg, melynek hátterében tenyészet sejteire jellemző heterogenitás állhat.

#### **VI.4.3. Az *in vitro* kallusz kultúrák lignán összetételének és mennyiségének vizsgálata, valamint az egyes kultúrák differenciálódott részeinek lignán tartalma**

Vizsgáltuk a lignán összetételt és tartalmat az egyes fajok sejtenyészeiben, valamint a közöttük lévő eltérések okait. A kallusztenyészetek morfológiai vizsgálata után a tenyészetek lignán bioszintézis különbségét vizsgáltuk az egyes fajok intakt és *in vitro*

sejttenyészetek, valamint az egyes fajok *in vitro* tenyészetek között (Eredmények 7. és 8. táblázat).

Az *in vitro* kultúrákban 2 lignán glikozid-aglikon pár jelenlétét tudtuk kimutatni, ezek a matairesinosid-matairesinol, és az arctiin-arctigenin (Eredmények 8. táblázat). A termések vizsgálatakor két faj esetében (*C. pannonica* és *C. scabiosa*) a trachelosid lignánt is ki tudtuk mutatni, de a *C. scabiosa in vitro*, differenciálódott, és differenciációt nem mutató kultúrájában már nem. Kallusz kultúrát a *C. pannonica*-ból nem tudtunk létrehozni.

Az összlignán tartalom szempontjából a *C. adjarica* hajtásdifferenciálódó kallusza tartalmazta a legtöbb lignánt, 4,4 mg g<sup>-1</sup>-ot. Szintén ez a kallusz kultúra tartalmazta a legtöbb arctiint is, 2,96 mg g<sup>-1</sup>-ot. A *C. adjarica* gyökérdifferenciációt mutató kallusz kultúrája pedig a legtöbb arctigenint, 1,92 mg g<sup>-1</sup>-ot.

A legtöbb matairesinosid, 2,28 mg g<sup>-1</sup>, a *C. scabiosa* gyökeres kalluszában fordult elő.

A *C. calcitrapa in vitro* kultúrája pedig a legtöbb matairesinolt, 1,18 mg g<sup>-1</sup>-ot.

A *Centaurea* fajok *in vitro* tenyészetek hatóanyag-tartalmát a genotípuson kívül jelentős mértékben befolyásolja a differenciáltság szintje is. Tudjuk, hogy van olyan faj (*C. adjarica*), amely ugyanazon a táptalajon egyaránt hajtásorganizációt és gyökérorganizációt is mutat. Az eltérő módon differenciálódott sejtek lignántartalma és összetétele eltérő. Ennek hátterében az állhat, hogy a morfológiai differenciáció hiánya zavart okoz az anyagcsere útvonalakban, és ezáltal veszteséget okoz az úgynevezett termelési potenciálban (Verpoorte és mtsai. 2000). Az organizációt nem mutató kallusz tenyészet összlignán tartalma elmarad a differenciáció valamely fokát mutató kultúráktól. A továbbiakban tervezzük vizsgálni, hogy a különböző hormonösszetétellel indukált organogenezis milyen hatással van a lignántermelésre.

Megfigyelhető a *C. adjarica* differenciációt mutató tenyészetek magas lignán tartalma. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy például egy külső elicitor, a fény, hatására a fotoszintetikus apparátus differenciálódásával együtt (lásd Eredmények 19. ábra) olyan sejtdifferenciálódási folyamatok is elindultak, többek között a klorenchima szövetréteg kialakulása, benne a gránulos kloroplasztiszok megjelenésével, amelyek a lignántermelést serkentették (Smolny és mtsai 1998). A megvilágítás lignántermelést fokozó hatásának a részletesebb elemzése során megállapították, hogy a fenilalanin képzéséhez szükséges eritróz-4-P molekula nagyobb mennyiségben termelődik intenzívebb fotoszintézis esetén (Lewis és mtsai. 1998). Így a megvilágítás a differenciáltabb fotoszintetikus apparátus segítségével tudta közvetve növelni a sejtenyészet lignántermelését. A megvilágítás hatása általánosan növelte

meg a lignánok mennyiségét, specifikusan nem fokozta egyes lignánok termelését, mivel az a bioszintézis útvonal kezdeti lépéseinél fejti ki hatását. A kloroplasztiszok fejlettségi állapota nagymértékben hozzájárul további másodlagos anyagcseretermékek termeltetéséhez, mint pl. a karotinoidokéhoz (Hirschberg 2001).

Az irodalomban is számos olyan faj ismert, amelynek *in vitro* differenciált sejtkultúrájában mért hatóanyag (pl. a furanokumarin) tartalom magasabb, mint a nem differenciált sejtekben (Diwan és Malpathak 2009). Hasonló megfigyelésekről, ahol a tenyésztet termelő és felhalmozó képessége összefüggésben állt a differenciációval, és a sejtszintű organizációval, is beszámoltak más másodlagos anyagcserecsaládoknál is, mint pl. az alkaloidoknál. A *Papaver bracteatum* szuszpenziós kultúrájában az alkaloid bioszintézis hasonlóképpen összhangban volt a sejtek differenciációs állapotával (St-Pierre és mtsai. 1999).

Az általunk vizsgált lignánokról egyre újabb, és újabb adatok jelennek meg neves folyóiratokban arra vonatkozóan, hogy jelentős szerepük lehet igen komoly betegségek, mint például a csontritkulás és a reumás ízületi gyulladás (Kim és mtsai. 2012), vagy a szélütés (Fan és mtsai. 2012) terápiájában. Ezek az eredmények szükségessé teszik e hatóanyagok nagy mennyiségben való hozzáférhetőségét, előállítását. A mai modern fermentorok alkalmasak nagy mennyiségű növényi sejtek tenyésztésére, de a magas fokú reprodukción kívül a növényi sejtenyésztet hatóanyag-termelő képessége is kritikus. Az *in vitro* sejtenyésztetek lignán termelésének fokozására megvannak a megfelelő módszerek (Petersen és Alftermann 2001, Fuss 2003, Karuppusamy 2009), melyeket egy lehetséges későbbi kísérletsorozat eredményeképpen a *C. adjarica in vitro* szuszpenziós kultúrájánál is alkalmazni tudunk. A stabil szuszpenziós kultúra létrehozása a következő lépés egy jövőbeni, nagyléptékű fermentációs technológia kidolgozásában, amelynek eredményeképpen ezek a lignánok nagy mennyiségben állíthatóak elő. Erre a technikai források a NövénySZervezettani Tanszék Biotechnológiai laborjában rendelkezésre állnak.

További kutatási téma lehet az eddig ismertett eredmények alapján a szomatikus embriógenézis technika alkalmazása, hogy a differenciálódott embriók hatóanyagtartalmát össze tudjuk hasonlítani a termések embrió részében mért lignán mennyiségével. A szakirodalomban erre vonatkozóan még nem áll rendelkezésünkre publikáció, de mint távolabbi cél, szintén szerepel terveink között.

## VII. KÖVETKEZTETÉSEK

1) Kimutattuk, hogy az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Cirsium arvense* fajok termése ígéretes alapanyag lehet a gyógyszeriparban lignánok előállítására. Azonosítottunk, és mennyiségileg meghatároztunk HPLC-UV és HPLC-ESPI-MS módszerekkel három glikozid-aglikon lignán párt, az arctiin-arctigenint, a matairesinol-matairesinosidot és a trachelosid-trachelogenint. A termésekben főleg lignán glikozidok találhatók, amelyekből trifluorecetsavas hidrolízissel kvantitatív módon kinyerhetők a stabil, és biológiai szempontból előnyösebb aglikonok.

2) Megállapítottuk, hogy az *Arctium lappa*, *Centaurea scabiosa* és *Cirsium arvense* fajok termésérési és csírázási fázisaiban változik a lignántartalom, melynek döntő többsége a termés embrió részében halmozódik fel; legelőnyösebb a termést fél-érett állapotban begyűjteni szabadföldi gyűjtéskor. Az *Arctium lappa* és a *Cirsium arvense* érett termése rendelkezik  $\beta$ -glikozidáz enzimmel, mely a lignán glikozidok hidrolíziséért felelős, viszont a *Centaurea scabiosa* glikozidáz enzime csak a csírázási folyamat során aktiválódik.

3) A *Centaurea* nemzetség 11 fajában megvizsgálva az arctiin-arctigenin, a matairesinosid-matairesinol, és a trachelosid-trachelogenin lignán glikozid/aglikon párok tartalmát és arányait az érett termésekben, azt tapasztaltuk, hogy a nemzetségen belül mindkét szempontból nagy változatosság van. Ezért a további kutatások előkészítéséhez szükséges az értekezésben bemutatott elővizsgálatokat elvégezni. A későbbi szövettanyészetekkel történő lignántermeltetési vizsgálatokhoz mindegyik rendelkezésre álló fajból megkíséreltük *in vitro* sejttanyészetek létrehozását.

4) Nyolc *Centaurea* fajból sikeresen *in vitro* szövettanyészetet hoztunk létre. A szövettanyészetekben a lignánok össz mennyisége lényegesen alacsonyabb volt a természetes növényi anyagéhoz képest, és a lignánok összetétele is eltérő volt. Ennek ellenére állíthatjuk, hogy az *in vitro* kultúrákkal való hatóanyag termeltetés előnyös lehet, mivel a természetből begyűjtött növényi anyag nagyon heterogén volt.

5) Megállapítottuk, hogy ugyanazon a táptalajon az egyes fajok teljesen eltérő differenciációt mutatnak, illetve egy tanyészetben belül is előfordulhatnak különféle differenciációs formák. A differenciálódott kalluszok mind lignán profilban, mind hatóanyag mennyiségben eltérnek a nem differenciálódott kalluszoktól. A szövettanyészeteknél tehát még azonos táptalajon nőtt kultúrák is heterogének voltak a kallusz differenciálódási útvonalait tekintve. A differenciáció pedig jelentős mértékben befolyásolja a lignántermelést.

A *C. adjarica* hajtásorganizációt mutató tenyészetében az arctiin tartalom, gyökérorganizációt mutató tenyészetében pedig az arctigenin tartalom volt a legmagasabb. Ez mutatja a hatóanyagtermelés szervspecifitásának a jelentőségét.

6) Az egyes *Centaurea* fajokból létrehozott *in vitro* sejt- és szövettényészetek alkalmasak lehetnek a lignánok hosszú távú, tartós forrást biztosító termelésére, amennyiben fokozni lehet lignán termelésüket. Az értekezésben bemutatott eredmények az *in vitro* termelés elvi lehetőségeit mutatták be. Annak ellenére, hogy ma még a természetből begyűjtött növényi nyersanyagokból lehet nagy mennyiségű lignánt izolálni, az *in vitro* sejttenyészetek ígéretes alapanyagok lehet a gyógyszeripar számára a lignánok hosszú távú, tartós forrást biztosító előállítására, mivel egy nagyléptékű fermentációs technológia kontrollált körülmények között zajlik, és gazdaságos formában üzemeltethető.



## VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A növényi másodlagos anyagcseretermékek közül az utóbbi időben többek között a lignánok kerültek a kutatások előterébe igen változatos, és jelentős gyógyászati tulajdonságaiknak köszönhetően. Doktori munkámban a biológiailag aktív lignánok azonosítását és mennyiségi meghatározását végeztük el magas lignántartalmú intakt és *in vitro* növényi mintákban a hatékony lignán kinyerés és termeltetés előkészítése érdekében.

HPLC-UV és HPLC-ESPI-MS módszerekkel azonosítottunk, és mennyiségileg meghatároztunk három glikozid-aglikon lignán párt, az arctiin-arctigenint, a matairesinol-matairesinosidot és a trachelosid-trachelogenint az *Arctium lappa*, *Cirsium arvense*, *Centaurea scabiosa*, és további 10 *Centaurea* faj érett terméseiben. A termésekben főleg lignán glikozidok találhatóak, amelyekből trifluorecetsavas vagy  $\beta$ -glikozidáz enzimés hidrolízissel kvantitatív módon kinyerhetőek a biológiai szempontból előnyösebb aglikonok. A lignán glikozidok a termés embrió részében halmozódnak fel, illetve, a szinte teljesen érett termések is közel ugyanannyi hatóanyagot tartalmaznak, mint a teljesen érettek. A termések csírázását követően sem bomlanak le a lignán glikozidok, de egy  $\beta$ -glikozidáz enzimés hidrolízist követően végbemegy a glikozid-aglikon átalakulás teljes mértékben. A *Centaurea* fajok érett terméseiben a 3 lignán pár összetételében és tartalmában kvalitatív és kvantitatív különbségek vannak. A későbbi szövettenyésztetekkel történő lignán termeltetési vizsgálatokhoz mindegyik rendelkezésre álló fajból célszerűnek tartottuk *in vitro* tenyészetek létrehozását.

Nyolc *Centaurea* fajból *in vitro* sejtenyészetet hoztunk létre. Mindegyik *Centaurea* sejtenyészet tartalmazott lignánokat, de összmennyisége lényegesen alacsonyabb volt a természetes növényi anyagokéhoz képest, és a lignánok összetétele is eltérő volt. A kallusz kultúrák igen heterogének voltak a kallusz differenciálódási útvonalait tekintve, amit morfológiai, anatómiai, és ultrastruktúrális vizsgálatokkal állapítottunk meg. A differenciáció pedig jelentős mértékben befolyásolja a lignántermelést. Annak ellenére, hogy ma még a természetből begyűjtött növényi nyersanyagokból lehet nagy mennyiségű lignánt izolálni, az *in vitro* sejtenyészetek ígéretes alapanyagok lehet a gyógyszeripar számára a lignánok hosszú távú, tartós forrást biztosító előállítására, mivel egy nagyléptékű fermentációs technológia kontrollált körülmények között zajlik, és gazdaságos formában üzemeltethető.

## VIII. SUMMARY

Plant secondary metabolites, including lignans, have gained increasing attention over the past decades, due to their various and remarkable pharmaceutical and medicinal properties. In this thesis, biologically active lignans were identified and quantified in intact and *in vitro* plant samples containing high amounts of lignans. This work may be a basis of an efficient lignan production and extraction.

Three lignan glycoside-aglicone pairs, namely arctiin-arctigenin, matairesinoside-matairesinol, and tracheloside-trachelogenin, were identified and quantified in ripe fruits of *Arctium lappa*, *Cirsium arvense*, *Centaurea scabiosa* and 10 *Centaurea* species. HPLC-UV and HPCL-ESI-MS methods were used. Lignan glycosides accumulate mainly in the fruits, from which the biologically advantageous aglycones can be quantitatively produced via hydrolysis with trifluoroacetic acid or  $\beta$ -glucosidase. The lignan glycosides accumulate in the embryo part of the achenes, and the yield of lignan glycosides is almost as high as in the ripe fruits. The lignan glycoside contents remained unchanged during germination; however a  $\beta$ -glucosidase enzymatic hydrolysis takes place, thus the glycosides completely hydrolyzed into their corresponding aglycones. Investigating the lignan contents of ripe fruits of *Centaurea* species, qualitative and quantified differences were identified in the distribution and contents of the three lignan pairs. Thus the establishment of *in vitro* cultures from all available species seemed to be promising for the further investigations in tissue cultures.

*In vitro* callus cultures were established from eight *Centaurea* species. The *in vitro* cell cultures contained lignans, but the yield was well below of those of the intact plant samples and also the lignan compositions differed. The differentiation pathways were heterogeneous, which were found by morphological, anatomical, and ultrastructural studies. Lignan production was influenced by the cell differentiation state. Although high amounts of lignans can nowadays be extracted exclusively from intact plant samples, the use of *in vitro* cell cultures in the pharmaceutical industry is promising on a long-term. Continuous lignan production can be achieved, because a large-scale fermentation technology can operate economically in a controlled environment.

## IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Böddi Béla tanszékvezető egyetemi tanárnak, az MTA doktorának, hogy lehetővé tette doktori munkám elkészítését a Növénysszervezettani Tanszéken. Emellett útmutató irányításával segítette munkámat a kísérleti eredmények rendezésében, megvitatásában és a disszertáció megírásában. Kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam hozzá.

Hálásan köszönöm Dr. Gyurján István egyetemi tanárnak, hogy bátorított a doktori képzésre való jelentkezésre. Témavezetőként végig kiemelt figyelemmel, és fáradtságot nem kímélve irányította munkámat, ellátott ötletekkel, és a kísérletek során felmerülő elméleti és gyakorlati problémák megoldásában élete végéig készséggel segítségemre volt.

Köszönöm dr. Preininger Éva egyetemi adjunktusnak a laboratóriumi munkában és a mikroszkópiában, valamint az eredmények kiértékelésében nyújtott munkáját, segítségét.

Köszönöm dr. Boldizsár Imre egyetemi adjunktusnak, hogy megtanított a HPLC berendezés használatára, az eredmények kiértékelésére és nagyon köszönöm segítségét, amellyel nemcsak a közös cikkek megjelentetésében fáradozott.

Köszönöm dr. Sedlák Éva támogató bátorítását, hogy segítségemre volt a laboratóriumi munkában és az élet egyéb területein is.

Külön köszönöm Pólya Sára szakdolgozónak a segítséget.

Köszönet illeti Dr. Perlné Molnár Ibolya professzor asszonyt (ELTE Analitikai Kémia Tanszék) a kromatográfiás mérésekben, és a megjelent publikációkban nyújtott segítségéért.

Köszönöm Kálmán Ágnes, Seres Adrienne asszisztenseknek, Jónás Csilla tanszéki mérnöknek, hogy az elmúlt évek során a laborban mindig mindenben segítségemre voltak, precíz és lelkiismeretes munkájukkal jelentős mértékben hozzájárultak a kísérletek eredményességéhez.

Köszönöm a Növénysszervezettani Tanszék minden dolgozójának, hogy szakmai és emberi támogatásukkal segítették munkámat.

Végül, de nem utolsó sorban családomnak szeretnék köszönetet mondani, hogy bármit is hozott az élet, akár rosszat, akár jót, végig támogatásukról biztosítottak. Szeretném egész munkám során tőlük kapott szeretetük és bátorításuk viszonzásaképpen ezt a dolgozatot nekik ajánlani.

## X. IRODALOMJEGYZÉK

- Abou-Alaiwi, W. A., Potlakayala, S. D., Goldman, S. L., Josekutty, P. C., Karelia, D. N., & Rudrabhatla, S. V. (2012). Agrobacterium-mediated transformation of the medicinal plant *Centaurea montana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(1), 1-8.
- Aslan, U., & Oeksuez, S. (1999). Chemical constituents of *Centaurea cuneifolia*. *Turkish Journal of Chemistry*, 23, 15-20.
- Alaiwi, W. A., Sairam, R. V., Josekutty, P. C., Potlakayala, S. D., Karelia, D., & Goldman, S. L. (2012). In vitro regeneration, flowering, and cell culture of *Centaurea* species. *African Journal of Biotechnology*, 11(9), 2296-2302.
- Awale, S., Lu, J., Kalauni, S. K., Kurashima, Y., Tezuka, Y., Kadota, S., & Esumi, H. (2006). Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer research*, 66(3), 1751-1757.
- Ayres, D. C., & Loike, J. D. (1990). Chemistry and pharmacology of natural products. *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., & Bollinger, W. H. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science(Washington)*, 228(4704), 1154-1159.
- Bastos, M. M., Kijjoa, A., Cardoso, J. M., Gutiérrez, A. B., & Herz, W. (1990). Lignans and other constituents of *Centaurea sphaerocephala* ssp. *Polyacantha*. *Planta medica*, 56(04), 403-405.
- Bloedon, L. T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S. C., Berlin, J. A., Rader, D. J., & Szapary, P. O. (2008). Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(1), 65-74.
- Boldizsár, I., Füzfa, Z., Tóth, F., Sedlák, É., Borsodi, L., & Molnár-Perl, I. (2010a). Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts. *Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1674-1682.
- Boldizsár, I., Krasznai, M., Tóth, F., Noszál, B., & Molnár-Perl, I. (2010b). Complementary fragmentation pattern analysis by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry confirmed the precious lignan content of *Cirsium* weeds. *Journal of Chromatography A*, 1217(40), 6281-6289.
- Bruno, M., Diaz, J. G., & Herz, W. (1991). Guaianolides and lignans from *Centaurea solstitialis* subs *Schouwii*. *Phytochemistry*, 30(12), 4165-4166.
- Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262(5136), 1051-1054.
- Buitelaar, R. M., & Tramper, J. (1992). Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal of biotechnology*, 23(2), 111-141.

- Burlat, V., Kwon, M., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2001). Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry*, 57(6), 883-897.
- Byung Hoon, H., Young Hwa, K., Hyun Ok, Y., & Park, M. K. (1994). A butyrolactone lignan dimer from *Arctium lappa*. *Phytochemistry*, 37(4), 1161-1163.
- Cabral, M. M. O., Kelecom, A., & Garcia, E. S. (1999). Effects of the lignan, pinorexinol on the moulting cycle of the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus* and of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Fitoterapia*, 70(6), 561-567.
- Cansaran, A., Doğan, N. M., Öztekin, M., & Acar, G. (2010). Antimicrobial activity of various extracts of *Centaurea cankiriense* A. Duran and H. Duman. *African Journal of Microbiology Research*, 4(8), 608-612.
- Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
- Çelik, S., Rosselli, S., Maggio, A. M., Raccuglia, R. A., Uysal, I., Kisiel, W., Michalska, K. & Bruno, M. (2006). Guaianolides and lignans from the aerial parts of *Centaurea ptoisimopappa*. *Biochemical systematics and ecology*, 34(4), 349-352.
- Cho, M. K., Jang, Y. P., Kim, Y. C., & Kim, S. G. (2004). Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits MAP kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF- $\alpha$  inhibition. *International immunopharmacology*, 4(10), 1419-1429.
- Choi, Y. H., Kim, J., & Yoo, K. P. (2003). High performance liquid chromatography-electrospray ionization MS-MS analysis of *Forsythia koreana* fruits, leaves, and stems. Enhancement of the efficiency of extraction of arctigenin by use of supercritical-fluid extraction. *Chromatographia*, 57(1-2), 73-79.
- Christensen, L. P., & Lam, J. R. (1991). Flavones and other constituents from *Centaurea* species. *Phytochemistry*, 30(8), 2663-2665.
- Clavel, T., Borrmann, D., Braune, A., Doré, J., & Blaut, M. (2006). Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe*, 12(3), 140.
- Cockayne, T. O. (1961). Leech book of Bald: Leechdom, Wortcunnings and Satrcraft of Early England, vol II. *The Holland Press, London*. 313.
- Cooper, G., Laird, A., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2002). Lignan glucosides from the seeds of *Centaurea americana* (Compositae). *Biochem. Syst. Ecol*, 30(1), 65-67.
- Cuenca, S., Amo-Marco, J. B., & Parra, R. (1999). Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk.(Compositae). *Plant cell reports*, 18(7-8), 674-679.
- Cuenca, S., & Amo-Marco, J. B. (2000). In vitro propagation of *Centaurea spachii* from inflorescence stems. *Plant growth regulation*, 30(2), 99-103.
- Csupor, D., Blazsó, G., Balogh, Á., & Hohmann, J. (2010). The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 127(1), 193-195.
- Csupor, D., Widowitz, U., Blazsó, G., Laczkó-Zöld, E., Tatsimo, J. S., Balogh, Á., Boros, K., Dankó, B., Bauer, R. & Hohmann, J. (2012). Anti-inflammatory Activities of Eleven

Centaurea Species Occurring in the Carpathian Basin. *Phytotherapy Research*, 27(4), 540-544.

Dános, B. (2007). *Silybum marianum* fehérvirágú fajtájának (Szibilla®) flavanolignán képzése a termésfejlődéssel összefüggésben. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 77, 47-51.

Davin, L. B., Bedgar, D. L., Katayama, T., & Lewis, N. G. (1992). On the stereoselective synthesis of (+)-pinoresinol in *Forsythia suspensa* from its achiral precursor, coniferyl alcohol. *Phytochemistry*, 31(11), 3869-3874.

Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2000). Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiology*, 123(2), 453-462.

Dayan, F. E., Kuhajek, J. M., Canel, C., Watson, S. B., & Moraes, R. M. (2003). *Podophyllum peltatum* possesses a  $\beta$ -glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1646(1), 157-163.

Degenhardt, A., Habben, S., & Winterhalter, P. (2002). Isolation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Journal of chromatography A*, 943(2), 299-302.

Deus, B., & Zenk, M. H. (1982). Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotechnology and Bioengineering*, 24(9), 1965-1974.

Dinkova-Kostova, A. T., Gang, D. R., Davin, L. B., Bedgar, D. L., Chu, A., & Lewis, N. G. (1996). (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia* protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46), 29473-29482.

Diwan, R., & Malpathak, N. (2009). Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(1), 108-116.

Djeddi, S., Argyropoulou, C., & Skaltsa, H. (2008). Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp. *grisebachii*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(5), 336-339.

Erdemgil, Z., Rosselli, S., Maggio, A. M., Raccuglia, R. A., Celik, S., Michalska, K., Kisiel, W. & Bruno, M. (2006). An unusual pregnane derivative and dibenzylbutyrolactone lignans from *Centaurea sclerolepis*. *Polish journal of chemistry*, 80(4), 647-650.

Fan, T., Jiang, W. L., Zhu, J., & Feng Zhang, Y. (2012). Arctigenin Protects Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Rats through Inhibiting Neuroinflammation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(11), 2004-2009.

Ferguson, C. A., Nahar, L., Finnie, D., Kumarasamy, Y., Reid, R., MirBabayev, N. F., & Sarker, S. D. (2003). *Centaurea scabiosa*: a source of dibenzylbutyrolactone lignans. *Biochem. Syst. Ecol*, 31(3), 303-305.

Ferracane, R., Graziani, G., Gallo, M., Fogliano, V., & Ritieni, A. (2010). Metabolic profile of the bioactive compounds of burdock (*Arctium lappa*) seeds, roots and leaves. *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 51(2), 399-404.

Flamini, G., Stoppelli, G., Morelli, I., Ertugrul, K., Dural, H., Tugay, O., & Demirelma, H. (2004). Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. *Biochemical systematics and ecology*, 32(6), 553-557.

- Flores, H. E., Dai, Y. R., Cuello, J. L., Maldonado-Mendoza, I. E., & Loyola-Vargas, V. M. (1993). Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. *Plant physiology*, 101(2), 363-371.
- Fortuna, A. M., de Riscala, E. C., Catalan, C. A., Gedris, T. E., & Herz, W. (2001). Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochemical systematics and ecology*, 29(9), 967-971.
- Fuss, E. (2003). Lignans in plant cell and organ cultures: an overview. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 307-320.
- Gamborg, O. L., Miller, R., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151-158.
- Gang, D. R., Costa, M. A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A. T., Wang, H. B., Burlat, V., Sarkanen, S., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chemistry & biology*, 6(3), 143-151.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(4), 272-289.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant tissue culture procedure-Background. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 1-28). Springer Netherlands.
- Ghisalberti, E. L. (1997). Cardiovascular activity of naturally occurring lignans. *Phytomedicine*, 4(2), 151-166.
- Gordaliza, M., Garcia, P. A., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A., & Gomez-Zurita, M. A. (2004). Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*, 44(4), 441-459.
- Groyne, J., Lognay, G., & Marlier, M. (1999). Accumulation of glycosidically bound compounds in *Fragaria\* ananassa* cv. Elsanta fruits at various developmental stages. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 3(1), 5-9.
- Guo, H., Liu, A. H., Ye, M., Yang, M., & Guo, D. A. (2007). Characterization of phenolic compounds in the fruits of *Forsythia suspensa* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 21(5), 715-729.
- Hansel, R., Schulz, H., Leuckert, Ch., (1964). Das Lignan glykosid Arctiin als chemotaxonomisches Merkmal in der Familie der Compositae. *Z. Naturforsch.*, 19b, 727-734.
- Harmatha, J., & Dinan, L. (2003). Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews*, 2(3), 321-330.
- Harmatha, J., Buděšínský, M., Vokáč, K., Pavlík, M., Grüner, K., & Laudová, V. (2007). Lignan glucosides and serotonin phenylpropanoids from the seeds of *Leuzea carthamoides*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 72(3), 334-346.
- Harmatha, J., Zídek, Z., Kmoníčková, E., & Šmidrkal, J. (2011). Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. *Interdiscip Toxicol.*, 4(1), 5-10.

- Hart, J. H., Wardell, J. F., & Hemingway, R. W. (1975). Formation of oleoresin and lignans in sapwood of white spruce in response to wounding. *Phytopathology*, 65(4), 412-417.
- Hausott, B., Greger, H., & Marian, B. (2003). Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129(10), 569-576.
- Haworth, R. D. (1936). Natural resins. *Annual Report Progress Chemistry*, 33, 266-279.
- Hegnauer, R. (1962). *Chemotaxonomie der Pflanzen. Eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Vol. I. Thallophyten, Bryophyten, Pteridophyten und Gymnospermen* (Vol. 517). Birkhauser Verlag, Basel & Stuttgart.
- Hirano, T., Gotoh, M., & Oka, K. (1994). Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life sciences*, 55(13), 1061-1069.
- Hirose, M., Yamakawa, T., Kodama, T., & Komamine, A. (1990). Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant and cell physiology*, 31(2), 267-271.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current opinion in plant biology*, 4(3), 210-218.
- Hosoki, T., & Kimura, D. (1997). Micropropagation of *Centaurea macrocephala* Pushk. ex Willd. by shoot-axis splitting. *HortScience*, 32(6), 1124-1125.
- Hösel, W., & Conn, E. E. (1982). The aglycone specificity of plant  $\beta$ -glycosidases. *Trends in biochemical sciences*, 7(6), 219-221.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Saba Ansari, M., Rahman, A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(1), 10.
- Imbert, T. F. (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie*, 80(3), 207-222.
- Ishida, J., Wang, H. K., Oyama, M., Cosentino, M. L., Hu, C. Q., & Lee, K. H. (2001). Anti-AIDS agents. 46. 1 Anti-HIV activity of harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. *Journal of natural products*, 64(7), 958-960.
- Jain, R., Sinha, A., Jain, D., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2011). Adventitious shoot regeneration and in vitro biosynthesis of steroidal lactones in *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(1), 135-140.
- Janackovic, P., Tesevic, V., Milosavljevic, S., Vajs, V., & Marin, P. D. (2004). Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. *Biochem. Syst. Ecol*, 32(3), 355-357.
- Jang, Y. P., Kim, S. R., Choi, Y. H., Kim, J., Kim, S. G., Markelonis, G. J., Oh, T.H., & Kim, Y. C. (2002). Arctigenin protects cultured cortical neurons from glutamate-induced neurodegeneration by binding to kainate receptor. *Journal of neuroscience research*, 68(2), 233-240.
- Jin, J. S., Zhao, Y. F., Nakamura, N., Akao, T., Kakiuchi, N., & Hattori, M. (2007). Isolation and characterization of a human intestinal bacterium, *Eubacterium* sp. ARC-2, capable of demethylating arctigenin, in the essential metabolic process to enterolactone. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(5), 904-911.



- Jordon-Thaden, I. E., & Louda, S. M. (2003). Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds?. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(12), 1353-1396.
- Takegawa, K., Kaneko, Y., Hattori, E., Koike, K., & Takeda, K. (1987). Cell cultures of *Centaurea cyanus* produce malonated anthocyanin in UV light. *Phytochemistry*, 26(8), 2261-2263.
- Takegawa, K., Hattori, E., & Koike, K. (1991). Induction of anthocyanin synthesis and related enzyme activities in cell cultures of *Centaurea cyanus* by UV-light irradiation. *Phytochemistry*, 30(7), 2271-2273.
- Kang, K., Lee, H. J., Kim, C. Y., Lee, S. B., Tunsag, J., Batsuren, D., & Nho, C. W. (2007). The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2352-2359.
- Kang, H. S., Lee, J. Y., & Kim, C. J. (2008). Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *Journal of ethnopharmacology*, 116(2), 305-312.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, 3(13), 1222-1239.
- Katayama, T., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1992). An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry*, 31(11), 3875-3881.
- Kelly, M. G., & Hartwell, J. L. (1954). The biological effects and the chemical composition of podophyllin: a review. *Journal of the National Cancer Institute*, 14(4), 967-1010.
- Kessler, F., & Vidi, P. A. (2007). Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications. In *Green Gene Technology* (pp. 153-172). Springer Berlin Heidelberg.
- Kim, S. H., Jang, Y. P., Sung, S. H., Kim, C. J., Kim, J. W., & Kim, Y. C. (2003). Hepatoprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(8), 1202-1205.
- Kim, H. J., Ono, E., Morimoto, K., Yamagaki, T., Okazawa, A., Kobayashi, A., & Satake, H. (2009). Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture. *Plant and cell physiology*, 50(12), 2200-2209.
- Kim, A. R., Kim, H. S., Lee, J. M., Choi, J. H., Kim, S. N., Kim, D. K., Kim, J. H., Mun, S. H., Kim, J. W., Jeon, H. S., Kim, Y. M., & Choi, W. S. (2012). Arctigenin suppresses receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL)-mediated osteoclast differentiation in bone marrow-derived macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 682(1), 29-36.
- Kitagawa, S., Hisada, S., & Nishibe, S. (1984). Phenolic compounds from *Forsythia* leaves. *Phytochemistry*, 23(8), 1635-1636.
- Kitarou, O., Toshihiko, H., Masayuki, K., Kunio, H., (1989a). Antitumor agent. Patent abstracts of Japan. 01031717 A.
- Kitarou, O., Toshihiko, H., Masayuki, K., Kunio, H., (1989b). Cardiotonic agent. Patent abstracts of Japan. 01031716 A.

- Kitarou, O., Sachiko, H., Toshihiko, H., Takashi, N., Kunio, H., (1989c). New lignan and immunosuppressive agent containing the same lignan as active ingredient. Patent abstracts of Japan. 05032580 A.
- Koubaa, I., Damak, M., McKillop, A., & Simmonds, M. (1999). Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia*, 70(2), 212-213.
- Koulman, A., Kubbinga, M. E., Batterman, S., Woerdenbag, H. J., Pras, N., Woolley, J. G., & Quax, W. J. (2003). A phytochemical study of lignans in whole plants and cell suspension cultures of *Anthriscus sylvestris*. *Planta medica*, 69(08), 733-738.
- Kwon, M., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2001). In situ hybridization and immunolocalization of lignan reductases in woody tissues: implications for heartwood formation and other forms of vascular tissue preservation. *Phytochemistry*, 57(6), 899-914.
- Lampe, J. W., Atkinson, C., & Hullar, M. A. (2006). Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1174-1181.
- Lavie, D., Levy, E. C., & Cohen, A. (1974). New germination inhibitor from *Aegilops ovata* L. *Nature*, 249, 388.
- Lee, Y., Lee, D. E., Lee, H. S., Kim, S. K., Lee, W. S., Kim, S. H., & Kim, M. W. (2011). Influence of auxins, cytokinins, and nitrogen on production of rutin from callus and adventitious roots of the white mulberry tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(1), 9-19.
- Lewis, N. G., Davin, L. B., & Sarkanen, S. (1998). Lignin and lignan biosynthesis: distinctions and reconciliations. In *ACS symposium series* (Vol. 697, pp. 1-28). American Chemical Society.
- Li, H. B., & Chen, F. (2005). Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1074(1), 107-110.
- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. D., & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933-8952.
- Liu, H., Zhang, Y., Sun, Y., Wang, X., Zhai, Y., Sun, Y., Sun, S., Yu, A., Zhang, H. & Wang, Y. (2010). Determination of the major constituents in fruit of *Arctium lappa* L. by matrix solid-phase dispersion extraction coupled with HPLC separation and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 878(28), 2707-2711.
- Lourenço, P. M., de Castro, S., Martins, T. M., Clemente, A., & Domingos, A. (2002). Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and microbial technology*, 31(3), 242-249.
- MacRae, W. D., & Towers, G. H. (1984). Biological activities of lignans. *Phytochemistry*, 23(6), 1207-1220.
- Mallón, R., Rodríguez-Oubiña, J., & González, M. L. (2010). In vitro propagation of the endangered plant *Centaurea ulreiae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(1), 31-39.
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., & Saberi, M. (1992). Sesquiterpene lactones and lignans from *Centaurea* species. *Phytochemistry*, 31(10), 3527-3530.

- Middleton, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., Nahar, L., Reid, R., & Sarker, S. D. (2003). Dibenzylbutyrolactone lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea nigra* (Asteraceae). *Biochemical systematics and ecology*, 31(6), 653-656.
- Milder, I. E., Arts, I. C., Putte, B. V. D., Venema, D. P., & Hollman, P. C. (2005). Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition*, 93(03), 393-402.
- Moss, G. P. (2000). Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry*, 72(8), 1493-1523.
- Mothana, R. A., Abdo, S. A., Hasson, S., Althawab, F., Alaghbari, S. A., & Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. *Evidence-based Complementary and alternative medicine*, 7(3), 323-330.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-479.
- Nishibe, S., Fujimoto, T., Nose, M., Takeda, T., Ogihara, Y., & Xu, G. (1993). Lignans from *Trachelospermum axillare*. *Phytochemistry*, 32(6), 1579-1581.
- Nose, M., Fujimoto, T., Takeda, T., Nishibe, S., & Ogihara, Y. (1992). Structural transformation of lignan compounds in rat gastrointestinal tract. *Planta medica*, 58(06), 520-523.
- Nose, M., Fujimoto, T., Nishibe, S., & Ogihara, Y. (1993). Structural Transformation of Lignan Compounds in Rat Gastrointestinal Tract; II. Serum Concentration of Lignans and their Metabolites\*. *Planta medica*, 59(02), 131-134.
- Nowak, G., Drozd, B., & Georgiadis, T. (1984). Sesquiterpene lactones: 29. Cnicin in species of the subgenus *Acrolophus* (Cass.) Dobroc. *Acta Soc. Bot. Pol*, 53(2), 199-205.
- Okunishi, T., Sakakibara, N., Suzuki, S., Umezawa, T., & Shimada, M. (2004). Stereochemistry of matairesinol formation by *Daphne* secoisolariciresinol dehydrogenase. *Journal of Wood Science*, 50(1), 77-81.
- Oxtoby, E., Dunn, M. A., Pancoro, A., & Hughes, M. A. (1991). Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic  $\beta$ -glucosidase (linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant molecular biology*, 17(2), 209-219.
- Ozawa, S., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (1993). Formation of (-)-arctigenin in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 32(3), 643-652.
- Ozel, C. A., Khawar, K. M., Mirici, S., Ozcan, S., & Arslan, O. (2006). Factors affecting in vitro plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fisch et. Mey). *Naturwissenschaften*, 93(10), 511-517.
- Páska, C., Innocenti, G., Kunvári, M., László, M., & Szilágyi, L. (1999). Lignan production by *Ipomoea cairica* callus cultures. *Phytochemistry*, 52(5), 879-883.
- Payne, G.F., Shuler, M.L. & Brodelius, P. (1987) Large scale plant cell culture. In: Lydersen, BJ (Ed.) Large Scale Cell Culture Technology. Carl Hanser Verlag, Munich. ISBN 3-446-14845-0; pp. 193-229.
- Perica, M. (2003). In vitro propagation of *Centaurea rupestris* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45(2), 127-130.

- Petersen, M., & Alfermann, W. A. (2001). The production of cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 55(2), 135-142.
- Pevallek-Kozlina, B. (1998). In vitro propagation of *Centaurea ragusina* L., a Croatian endemic species. *Acta Biol. Cracov*, 40, 21-24.
- Phillipson, J. D. (2007). Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, 68(22), 2960-2972.
- Potter, G. A., Patterson, L. H., Wanogho, E., Perry, P. J., Butler, P. C., Ijaz, T., Ruparelia, K. C., Lamb, J., Farmer, P. J., Stanley, L. A., & Burke, M. D. (2002). The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British journal of cancer*, 86(5), 774-778.
- Poulton, J. E. (1990). Cyanogenesis in plants. *Plant physiology*, 94(2), 401-405.
- Radić, S., Prolić, M., Pavlica, M., & Pevallek-Kozlina, B. (2005). Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L. *Environmental and experimental botany*, 54(3), 213-218.
- Radić, S., & Pevallek-Kozlina, B. (2010). Differential esterase activity in leaves and roots of *Centaurea ragusina* L. as a consequence of salinity. *Periodicum biologorum*, 112(3), 253-258.
- Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., & Wähälä, K. (2002). Enterolignans. *Journal of Chromatography B*, 777(1), 29-43.
- Rahman, M., Dewick, P. M., Jackson, D. E., & Lucas, J. A. (1990a). Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 29(6), 1841-1846.
- Rahman, M., Dewick, P. M., Jackson, D. E., & Lucas, J. A. (1990b). Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry*, 29(6), 1971-1980.
- Raposo, S., & Lima-Costa, M. E. (2006). Rheology and shear stress of *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures grown in bioreactor. *Biotechnology letters*, 28(6), 431-438.
- Rathore, M. S., & Shekhawat, N. S. (2009). Micropropagation of *Pueraria tuberosa* (Roxb. Ex Willd.) and determination of puerarin content in different tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(3), 327-334.
- Ribeiro, N. L., Nahar, L., Kumarasamy, Y., Mir Babayev, N., & Sarker, S. D. (2002). Flavonoid C-glucosides and a lignan from *Centaurea macrocephala* (Compositae). *Biochem. Syst. Ecol*, 30(11), 1097-1100.
- Saarinen, N. M., Penttinen, P. E., Smeds, A. I., Hurmerinta, T. T., & Mäkelä, S. I. (2005). Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses in vivo. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 93(2), 209-219.
- Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 89-99.
- Sakakibara, N., Nakatsubo, T., Suzuki, S., Shibata, D., Shimada, M., & Umezawa, T. (2007). Metabolic analysis of the cinnamate/monolignol pathway in *Carthamus tinctorius* seeds by a stable-isotope-dilution method. *Organic & biomolecular chemistry*, 5(5), 802-815.
- Schliemann, W. (1984). Hydrolysis of Conjugated Gibberellins by  $\beta$ -Glucosidases from Dwarf rice (*Oryza sativa* L. cv. «Tan-ginbozu»). *Journal of plant physiology*, 116(2), 123-132.

- Schmitt, J., & Petersen, M. (2002). Pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia* × *intermedia* cell suspension culture. *Plant cell, tissue and organ culture*, 68(1), 91-98.
- Schröder, H. C., Merz, H., Steffen, R., Müller, W. E., Sarin, P. S., Trumm, S., Schulz J & Eich, E. (1990). Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 45(11-12), 1215.
- Seal, A., Aykkal, R., Babu, R. O., & Ghosh, M. (2011). Docking study of HIV-1 reverse transcriptase with phytochemicals. *Bioinformation*, 5(10), 430.
- Sedlák, É., Boldizsár, I., Borsodi, L., Füzfa, Z., Molnár-Perl, I., Preininger, É., & Gyurján, I. (2008). Identification and quantification of lignans, carboxylic acids and sugars in the leaves of *Forsythia* species and cultivars. *Chromatographia*, 68(1), 35-41.
- Seigler, D. S. (1998). *Plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Pub, Boston, USA
- Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B., & Voigt, J. (1987). Hevea linamarase—a nonspecific  $\beta$ -glycosidase. *Plant physiology*, 83(3), 557-563.
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., & Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(7), 2741-2745.
- Shaik, S., Singh, N., & Nicholas, A. (2011). HPLC and GC analyses of in vitro-grown leaves of the cancer bush *Lessertia* (*Sutherlandia*) *frutescens* L. reveal higher yields of bioactive compounds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(3), 431-438.
- Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S. M., Majinda, R. R., & Sarker, S. D. (2004a). Epoxylignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(12), 1201-1204.
- Shoeb, M., Mukhlesur Rahman, M., Nahar, L., Delazar, A., Jaspars, M., Macmanus, M. S., & Sarker, S. D. (2004b). Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 87-93.
- Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S. M., Nahar, L., Thoo-Lin, P.K. & Sarker, S. D. (2005). Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*. *Tetrahedron*, 61(38), 9001-9006.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kumarasamy, Y., Jaspars, M., Nahar, L., Thoo-Lin, P. K., Nazemiyeh, H. & Sarker, S. D. (2006). Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*, 67(21), 2370-2375.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Kong-Thoo-Lin, P., Nahar, L., Celik, S., & Sarker, S. D. (2007a). Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 155-159.
- Shoeb, M., MacManus, S. M., Kong-Thoo-Lin, P., Celik, S., Jaspars, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2007b). Bioactivity of the extracts and isolation of lignans and a sesquiterpene from the aerial parts of *Centaurea pamphylica* (Asteraceae). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3).
- Simon, T. (1992). A magyarországi edényes flóra határozója, Harasztok – Virágos növények. Tankönyvkiadó, Budapest.

- Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food Biotechnology* (pp. 187-228). Springer Berlin Heidelberg.
- Smolnly, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shahsavari, A., Petersen, M., & Alfermann, A. W. (1998). Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry*, 48(6), 975-979.
- St-Pierre, B., Vazquez-Flota, F. A., & De Luca, V. (1999). Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. *The Plant Cell Online*, 11(5), 887-900.
- Suzuki, S., Umezawa, T., & Shimada, M. (2002). Stereochemical diversity in lignan biosynthesis of *Arctium lappa* L. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(6), 1262-1269.
- Suzuki, S., & Umezawa, T. (2007). Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of wood science*, 53(4), 273-284.
- Swarup, V., Ghosh, J., Mishra, M. K., & Basu, A. (2008). Novel strategy for treatment of Japanese encephalitis using arctigenin, a plant lignan. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(3), 679-688.
- Szokol-Borsodi, L., Sólyomváry, A., Molnár-Perl, I., & Boldizsár, I. (2012). Optimum Yields of Dibenzylbutyrolactone-type Lignans from *Cynareae* Fruits, During their Ripening, Germination and Enzymatic Hydrolysis Processes, Determined by On-line Chromatographic Methods. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 598-603.
- Takahashi, A., Takeda, K., & Ohnishi, T. (1991). Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant and cell physiology*, 32(4), 541-547.
- Takasaki, M., Konoshima, T., Komatsu, K., Tokuda, H., & Nishino, H. (2000). Anti-tumor-promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. *Cancer letters*, 158(1), 53-59.
- Tan, X. Q., Chen, H. S., Liu, R. H., Tan, C. H., Xu, C. L., Xuan, W. D., & Zhang, W. D. (2005). Lignans from *Trachelospermum jasminoides*. *Planta medica*, 71(01), 93-95.
- Tanaka, K., Kim, T. J., & Yamamoto, H. (2008). Analysis of the seiridium canker infected *Cupressocyparis leylandii* by tree compounds. *Bull. Col. Edu. Ibaraki Univ.(Nat. Sci.)*, 57, 85-96.
- Tsai, W. J., Chang, C. T., Wang, G. J., Lee, T. H., Chang, S. F., Lu, S. C., & Kuo, Y. C. (2011). Arctigenin from *Arctium lappa* inhibits interleukin-2 and interferon gene expression in primary human T lymphocytes. *Chinese medicine*, 6(1), 12.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., & Valentine, D. H. (Eds.). (1976). *Flora Europaea* (Vol. 4). Cambridge University Press.
- Umezawa, T. (2003). Diversity in lignan biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 2, 371-390.
- Uwe Fischer, A., & Alfermann, W. (1995). Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. *Journal of biotechnology*, 41(1), 19-28.

- Van der Schouw, Y. T., De Kleijn, M. J., Peeters, P. H., & Grobbee, D. E. (2000). Phytoestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, 10(3), 154.
- Vanhaelen, M., & Vanhaelen Fastré, R. (1975). Lactonic lignans from *Cnicus benedictus*. *Phytochemistry*, 14(12), 2709.
- Vermani, K., & Garg, S. (2002). Herbal medicines for sexually transmitted diseases and AIDS. *Journal of ethnopharmacology*, 80(1), 49-66.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., & Memelink, J. (2000). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic research*, 9(4-5), 323-343.
- Vidal, K., Guermache, F., & Widmer, T. L. (2004). In vitro culturing of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*) for screening biological control agents. *Biological Control*, 30(2), 330-335.
- Vlietinck, A. J., De Bruyne, T., Apers, S., & Pieters, L. A. (1998). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Medica*, 64(02), 97-109.
- Wang, L. Q. (2002). Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *Journal of Chromatography B*, 777(1), 289-309.
- Wiermann, R. O. L. F. (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. *The biochemistry of plants*, 7, 85-116.
- Willför, S. M., Smeds, A. I., & Holmbom, B. R. (2006). Chromatographic analysis of lignans. *Journal of chromatography. A*, 1112(1-2), 64-77.
- Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics*, 75(2), 225-233.
- Xia, Z. Q., Costa, M. A., Proctor, J., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2000). Dirigent-mediated podophyllotoxin biosynthesis in *Linum flavum* and *Podophyllum peltatum*. *Phytochemistry*, 55(6), 537-549.
- Xia, Z. Q., Costa, M. A., Pélissier, H. C., Davin, L. B., & Lewis, N. G. (2001). Secoisolariciresinol dehydrogenase purification, cloning, and functional expression implications for human health protection. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16), 12614-12623.
- Yakhontova, L. D., & Kibal'chich, P. N. (1971). The question of the content of arctiin in the seeds of *Arctium leiospermum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 7(3), 287-288.
- Yamauchi, S., Sugahara, T., Nakashima, Y., Okada, A., Akiyama, K., Kishida, T., Maruyama M & Masuda, T. (2006). Radical and superoxide scavenging activities of matairesinol and oxidized matairesinol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(8), 1934-1940.
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M. T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual review of nutrition*, 21(1), 381-406.
- Yoo, J. H., Lee, H. J., Kang, K., Jho, E. H., Kim, C. Y., Baturen, D., Tunsag, J., & Nho, C. W. (2010). Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8), 2247-2252.

- Youssef, D., & Frahm, A. W. (1995). Constituents of the Egyptian *Centaurea scoparia*; III. Phenolic constituents of the aerial parts. *Planta medica*, 61(06), 570-573.
- Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., & Aktumsek, A. (2011). Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Rec Nat Prod*, 5, 123-132.
- Zhuang, L. G., Seligmann, O., Jurcic, K., & Wagner, H. (1982). Constituents of *Daphne tangutica*. *Planta Med*, 45(3), 172-176.



## XI. FÜGGELÉKEK

Az értekezés alapját adó, impakt faktoros folyóiratban megjelent közlemények listája:

1. Sedlák, É., Boldizsár, I., **Borsodi, L.**, Füzfai, Z., Molnár-Perl, I., Preininger, É., & Gyurján, I. (2008).

Identification and quantification of lignans, carboxylic acids and sugars in the leaves of Forsythia species and cultivars.

*Chromatographia*, 68(1), 35-41.

2. Boldizsár, I., Füzfai, Z., Tóth, F., Sedlák, É., **Borsodi, L.**, & Molnár-Perl, I. (2010).

Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinoresinol and methylarctigenin: their gas and liquid chromatographic analysis in plant extracts.

*Journal of Chromatography A*, 1217(10), 1674-1682.

3. **Szokol-Borsodi, L.**, Sólyomváry, A., Molnár-Perl, I., & Boldizsár, I. (2012).

Optimum Yields of Dibenzylbutyrolactone-type Lignans from Cynareae Fruits, During their Ripening, Germination and Enzymatic Hydrolysis Processes, Determined by On-line Chromatographic Methods.

*Phytochemical Analysis*, 23(6), 598-603.

Gamborg B5 és MSA30 (Murashige & Skoog) táptalaj összetevők

| <b><u>Táptalaj összetevők</u></b> |   | <b>B5 (mg l<sup>-1</sup>)</b> | <b>MSA30 (mg l<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------------------------|---|-------------------------------|----------------------------------|
| <b><u>Makroelemek</u></b>         | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | -                             | 1650                             |
|                                   | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 134                           | -                                |
|                                   | KNO <sub>3</sub>                                    | 2500                          | 190                              |
|                                   | CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O                | 150                           | 440                              |
|                                   | MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O                | 250                           | 1370                             |
|                                   | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | -                             | 170                              |
|                                   | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O  | 150                           | -                                |
|                                   | Fe-EDTA   | 40                            | 40                               |
| <b><u>Mikroelemek</u></b>         | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 3                             | 6,2                              |
|                                   | MnSO <sub>4</sub> x4H <sub>2</sub> O                | -                             | 22,3                             |
|                                   | MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O                 | 10                            | -                                |
|                                   | ZnSO <sub>4</sub> x4H <sub>2</sub> O                | -                             | 8,6                              |
|                                   | ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O                | 2                             | -                                |
|                                   | KI  | 0,75                          | 0,83                             |
|                                   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O | 0,25                          | 0,25                             |
|                                   | CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O                | 0,025                         | 0,025                            |
|                                   | CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O                | 0,025                         | 0,025                            |
|                                   |   |                               |                                  |
| <b><u>Vitaminok</u></b>           | Mio-inozit  | 100                           | 100                              |
|                                   | Tiamin  | 10                            | 0,1                              |
|                                   | Nikotinsav  | 1                             | 0,5                              |
|                                   | Piridoxin   | 1                             | 0,5                              |
| <b><u>Aminosav</u></b>            | Glicin  | -                             | 2                                |
| <b><u>Cukor</u></b>               | Szaharóz  | 30 g l <sup>-1</sup>          | 30 g l <sup>-1</sup>             |
| <b><u>Agar</u></b>                |   | 8 g l <sup>-1</sup>           | 8 g l <sup>-1</sup>              |